ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 19 *No. 4* *DÉCEMBRE 1960*

PARTICULARITÉS DES "ÉCO-SYSTÈMES PHAGE-BACTÉRIE" DES SOUCHES DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* TYPE *GRAVIS*, ISOLÉES D'UN FOYER ÉPIDÉMIQUE

par

M. CIUCĂ, G. CALALB, ALICE SARAGEA et PAULA MAXIMESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de la Diphtérie et du Centre National de Lysotypie et Bactériophages-Références)

— Manuscrit reçu le 23 mars 1960 —

Les recherches de FREEMAN (1951) sur « l'induction » et le contrôle de la toxigénèse de *Corynebacterium diphtheriae*, par le bactériophage, largement confirmées par de nombreux auteurs, ont fait pendant les dernières années également l'objet de nos recherches, en utilisant la « méthode écologique d'étude » du complexe des caractères biologiques, de plus de 1000 souches de *C. diphtheriae* isolées dans différentes zones du pays, des malades, ainsi que des porteurs de germes, études effectuées par rapport aux manifestations cliniques et épidémiologiques locales de la maladie.

Les résultats des études entreprises de 1956 à 1959, dans les collectivités à foyer épidémique ou exemptes (sondage), ont montré la prévalence du *type gravis* — 54.7% — sur 30% *type mitis*, dépisté exclusivement chez les porteurs de germes, tandis que le *type intermedius*, ne dépassait pas 15,2% (malades et porteurs sains).

Sur plus de 1000 souches étudiées, 71,9% étaient lysorésistantes et 28,90% lysosensibles, susceptibles aux spécimens autochtones de phage diphtérique. Sur 70% des *souches toxigènes*, 58% étaient également *lysogènes*, élibérant le phage libre sans l'intervention d'un agent inducteur.

Foyer épidémique « Lhi »

Vers la fin de l'année 1959, on a signalé l'apparition de cas de diphtérie parmi les enfants de 7—14 ans de la localité — vaccinés irrégulièrement ou non-vaccinés — et dont 48% présentaient la réaction de Schick positive.

Parmi les 33 cas de maladie clinique, parus dans un intervalle de 40 jours, on signale 6 formes *graves*, 14 cas de *formes communes* et 13 cas *bénins*.

Sur 500 *enfants*, on a dépisté 68 *porteurs de germes* ayant subi le contact avec les malades. De tous les porteurs on a isolé le même type de souches: *C. diphtheriae* type *gravis toxigène* et *lysogène*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

En étudiant un total de 87 souches de *C. diphtheriae* isolées dans le foyer « Lhi » on a identifié un « *type gravis toxigène et lysogène de C. diphtheriae* », en quelque sorte différent quant aux systèmes phage-bactérie, (observations antérieures (1956—1959), effectuées dans d'autres régions du pays).

A. *Spécimens de phages utilisés dans les recherches comparées*:

— phages de référence d'origine: B (FREEMAN) et 25 Varsovie;

— phages diphtériques d'origine lysogène, autochtones, du même type que les premiers.

B. Souches lysosensibles « indicatrices »: — FREEMAN 1174, 1180, 411, 444, 770;

— 25 Varsovie et 2 souches autochtones — 338 et 431 — du même type phagique que les souches de FREEMAN.

Méthode de travail. Pour l'étude des souches on a utilisé les techniques décrites dans les travaux antérieurs (CIUCĂ et coll.) (1, 2, 3, 4, 5, 6):

— méthode de *Gundersen B.* et coll. (7) (1959) pour l'appréciation de la *lysogénie* des souches; — induction de la lysogénie dans certains cas, sous l'action des rayons U V (FISK ET BERTANI) —;

— essais de lysogénéisation — en milieu liquide — des souches toxigènes et non-lysogènes;

— multiplication des phages isolés d'après la méthode de NICOLLE (8);

— essais de neutralisation avec sérum/anti-phage (méthode *d'*ANDERSON et COWLESS (9)).

RÉSULTATS

Après avoir établi l'identité et les caractères communs des souches isolées du point de vue morphologique, biochimique, toxicité, comportement des « systèmes phages — *C. diphtheriae* », on a effectué des recherches très complètes sur la *souche* « 951 », *de type gravis, toxigène et lysogène* », dont la population microbienne contenait également des clones lysogènes et des clones lysosensibles, « *susceptibles exclusivement à leur propre phage* ». En vérité, les clones (40%) lysosensibles et non-lysogènes de la souche « 951 » n'étaient susceptibles qu'aux spécimens de phages élibérés par le reste des clones « lysogènes et lysorésistants » (60%).

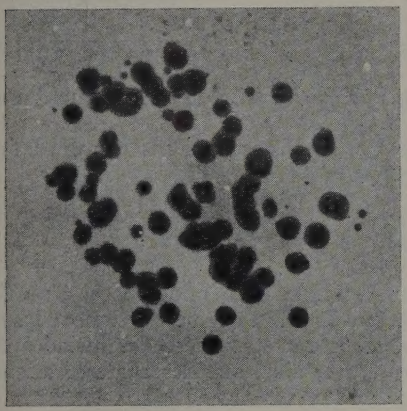
L'étude des clones lysogènes nous a permis facilement de distinguer deux spécimens de phages libres: un phage « P. c. » à plage claire et un phage à plage opaque « P.o. » (plage à bords opaques ombrés).

Morphologie et évolution des plages. Le phage « P.o. » — défini tempéré — donne constamment des plages de 0.5 à 3 mm diamètre, à centre clair et périphérie opaque. L'activité du phage « P.c. » sur la même souche indicatrice se manifeste par des plages à lyse parfaitement claire et à marges régulières; — dimension des plages de 0.5—3 mm diamètre et quelques petites plages « ponctuées » (à peine visibles).

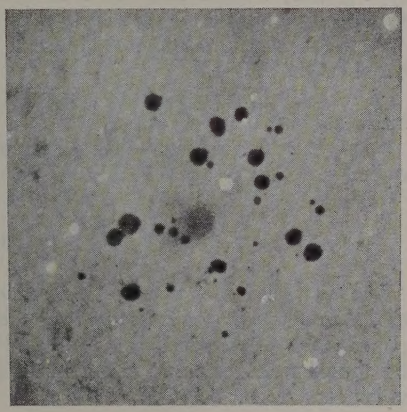
L'activité lytique des deux spécimens de phages, était limitée aux *clones lysosensibles de la même souche* « Lhi », ainsi qu'à des souches provenant de 4 autres agglomérations rurales voisines-: F.A.D.O. (souches isolées jusqu'en avril

1960); les souches FREEMAN et VARSOVIE n'étaient pas sensibles aux deux phages, à l'exception de la souche FREEMAN 1180 de type mitis non-toxigène et non-lysogène qui devenait sensible vis-à-vis des phages à peine après 20—30 passages.

La lyse à plage opaque était accompagnée du phénomène de lysogénéisation et conversion vers la toxigénèse de la souche lyso-sensible.



Photographie 1. Phage à „plage opaque" provenant de la souche „951 Lhi"



Photographie 2. Phage à „plage claire" provenant de la souche „951 Lhi"

Les résultats de ces essais montrent donc une activité lytique particulière de ce « lysotype » local de *C. diphtheriae gravis* vis-à-vis d'approximativement 200 souches lysosensibles de *C. diphtheriae* type *gravis* (identifiées pendant les derniers mois) provenant de différentes agglomérations, par comparaison au nombre relativement très réduit de souches lysosensibles identifiées pendant nos recherches antérieures, à l'aide des spécimens de phage de type B FREEMAN et 25 VARSOVIE.

Un des caractères specifiques du phage « Lhi » est constitué par une production particulièrement active, après maturation du phage à plage opaque « P.o. » — marquant des titres atteignant 10^{19} — supérieurs aux titres du phage « P.c. » qui ne dépasse le titre de 10^{10}. (après un nombre égal de multiplication).

On constate d'ailleurs, également, des *variations de susceptibilité* du « P.o. » et « P.c. » aux *agents physiques*, le phage « P.o. » étant plus sensible au chauffage de 40—54° (pendant 15, 30 et 60 minutes) que le phage « P.c. » dont le titre baisse plus faiblement et dans une moindre mesure. Une température de 60°C exerce une forte dégradation sur les deux spécimens de phage « Lhi ».

L'action dégradante du chloroforme et du thymol agit également, plus rapidement sur le « P.o. », que sur le « P.c. ».

En conclusion, malgré sa grande capacité de multiplication, le phage « P.o. » représente un spécimen beaucoup plus vulnérable aux agents physiques et chimiques que le phage « P.c. ».

Antigénité. Les phages « P.o. » et « P.c. » possèdent une capacité antigénique très marquée; les titres neutralisants — directs et croisés — strictement spécifiques des sérums immuns dépassent 1:2048. On ne constate pas l'activité neutralisante de ces sérums envers les phages référence de type FREEMAN et Varsovie.

Les résultats des essais sur la *capacité lysogénéisante* des deux spécimens du phage « Lhi » sur 12 souches non-lysogènes et atoxigènes de C.d. — 6 de type *gravis*, 4 types *mitis* et deux souches « *atypiques* » — ont mené aux conclusions suivantes:

— Conversion à la toxigénèse à l'aide de « P.o. » de 2 souches *mitis* et 2 souches *atypiques*.

— On n'a réalisé la conversion à la toxigénèse à l'aide du « P.c. » que d'une seule souche de type *mitis*.

— Les 6 souches — lysorésistantes — de type *gravis* n'ont pas été attaquées par les phages « Lhi ».

RÉSUMÉ

Des recherches ont été effectuées sur un type épidémique local de « *C. diphtheriae*, type *gravis toxigène* » — portant un double système de clones: lysogènes (60%) et lysosensibles (40%); 34 souches ont été isolées des malades et 84 souches des porteurs contacts du foyer « Lhi », ainsi que des agglomérations voisines: F.A.D.O.

Des études de détails d'une de ces souches locales, le type « 951 », présentant la même « manière » de comportement — mettent en évidence les faits suivants:

— libération spontanée de 2 « spécimens » de phage: « P.o. » (plage opaque) et « P.c. » (plage claire), dont *l'activité lytique et lysogénéisante s'exerce uniquement sur des souches gravis du foyer « Lhi » et des foyers* F.A.D.O.;

— action lytique nulle sur les souches lysosensibles autochtones de type FREEMAN et sur des souches de référence FREEMAN et VARSOVIF, — à l'exception de la souche FREEMAN 1180, dont la susceptibilité au phage « Lhi » n'a été acquise qu'après plus de 20 passages « apparemment négatifs »;

— l'antigénité strictement *spécifique* du phage « Lhi » est mise en évidence par une action neutralisante positive des sérums immuns envers les mêmes phages et nulle pour les phages références FREEMAN et les phages autochtones provenant d'autres foyers de diphtérie (souches de type FREEMAN isolées par nous en 1956—1959);

— la coexistence — dans une même souche — de clones lysogènes et clones lysosensibles d'une part et la mise en liberté des phages: « P.o. et P.c. » actifs sur les clones lysosensibles de la même souche d'autre part, pourrait expliquer éventuellement l'extension et le maintien de cette souche lysogène fortement virulente de la collectivité « Lhi » et des 4 autres agglomérations avoisinantes.

Les résultats des premiers essais sur l'activité lysogénéisante du phage « Lhi» sur un certain nombre de *souches « atypiques » de C. diphtheriae* présentent également un intérêt particulier du point de vue du procès d'induction des formes de variation par le phage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ciucă M., Saragea A., Ţupa S. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 153.
2. Ciucă M., Saragea A. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958 **17**, 613.
3. Ciucă M., Popovici M., Saragea A. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958 **17**, 595.
4. Calalb G., Saragea A. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 257.
5. Ciucă M., Nestoresco N. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 493.
6. Ciucă M., Nestoresco N., Popovici M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 509.
7. Gundersen W. B. — Acta Pathol. et Microbiol. Scandinavica, 1959, **47**, 65.
8. Nicolle Ch. — Rev. fr. d'études classiques et biologiques. 1957, **11**, 929.
9. Anderson P. S. et Cowless. — J. of Bact., 1959, **3**, 272.
10. Bordet J. et Ciucă M. — C. R. Soc. Biol. Paris, 1921, **84**, 276 et 747.

ОСОБЕННОСТИ «ЭКОСИСТЕМ ФАГ-БАКТЕРИЯ» У ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* ТИПА *GRAVIS* ИЗОЛИРОВАННЫХ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ ОЧАГЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Исследования касаются нетоксигенного «местного эпидемического типа C. diphtheriae» типа g avis. Тип характеризуется сосуществованием двойной системы клонов: лизогенных в 60% и лизочувствительных в 40%; 34 штамма выделены от больных и 84 штамма от контактов в очаге «Л». Ряд других сходных штаммов выделены в других коллективах, в той же области, в течении 5—6 месяцев, начиная с октября 1950 до апреля 1960.

Некоторые из этих местных штамов подвергались детальному изучению: «штамм 951» — сходный со всех точек зрения со всеми другими штаммами данного очага.

Выявлены следующие факты:

— спонтанное освобождение этими двумя штаммами 2 видов фага «Л»: фаг «Т. П.» (темное пятно) и фаг «С. П.» (светлое пятно), причем *литическое и лизогенизирующее действие данных фагов проявляется только по отношению к штаммам gravis из очага «Л» и из очагов Ф.А.Д.О.*

— отсутствие литического действия по отношению к местным лизочувствительным штаммам типа Фримэна и к эталонным штаммам Фримэна и варшавскому штамму — с исключением штамма Фримэн 1180, который стал чувствительным к фагу «Л» только после 20 пассажей.

— Строго *специфичная* антигенность фага «Л» выявляется путем отсутствия нейтрализующего действия иммунных сывороток по отношению к эталонным фагам Фримэна и к местным фагам, происходящим из других очагов дифтерии, в стране (штаммы, изолированные в 1956—1959).

— сосуществование в «одном-же штамме» лизогенных и лизочувствительных клонов с одной стороны; освобождение фагов «Т. П.» и «С. П.», активных по отношению к лизочувствительным клонам-сестрам — из одного же бактерийного населения могло бы объяснить распространение и сохранение этого лизогенного и вирулентного штамма в коллективе «Л» и в других четырех соседних коллективах.

Результаты первых испытаний лизогенизирующего действия фагов «Л» на ряд «атипичных» штаммов C. diphtheriae представляют также особый интерес в отношении процесса индукции вариационных форм, определяемых дифтерийным фагом.

BESONDERHEITEN DER „PHAGEN-BAKTERIEN ÖKOSYSTEME" BEI DEN *GRAVIS*-STÄMMEN VON *CORYNEBAKTERIUM DIPHTHERIAE*, DIE AUS EINEM EPIDEMISCHEN HERD ISOLIERT WURDEN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen betreffen einen „örtlichen, epidemischen Typus von *C. diphtheriae*" (Typus gravis, toxigen). Dieser Typus ist durch das gleichzeitige Vorhandensein eines doppelten Systems von Klonen ausgezeichnet: 60% lysogene und 40% lysosensible. Es wurden von Patienten 24 Stämme und von Kontaktpersonen 84 Stämme im Herd „Lhi" isoliert. Eine Reihe ähnlicher Stämme wurden in anderen Gemeinschaften der gleichen Gegend, während einer Zeitspanne von 5—6 Monaten (Oktober 1950 bis April 1960) isoliert.

Eingehende Untersuchungen wurden an einigen dieser örtlichen Stämme durchgeführt, z.B. am „Stamm 951" der in jeder Hinsicht den anderen aus dem Herd isolierten Stämmen gleicht.

Es wurden folgende Beobachtungen gemacht:

— Alle diese Stämme setzen spontan zwei Arten von „Lhi"-Phagen in Freiheit, nämlich einen „U.P."-Phagen (undurchsichtige Plaques) und einen „D.P."-Phagen (durchsichtige Plaques), *deren lytische und lysogenisierende Wirksamkeit sich nur an den Gravis-Stämmen des Herdes „Lhi" und der Herde F.A.D.O. äussert.*

Auf einheimische lysosensible Stämme des Typus FREEMAN und auf die Bezugsstämme FRREEMAN und WARSCHAU ist die lytische Wirkung null. Eine Ausnahme bildet der Stamm FREEMAN 1180, dessen Empfindlichkeit auf den „Lhi"-Phagen aber erst nach 20 blinden Passagen erworben wurde.

— Die streng *spezifische* Antigenität des „Lhi"-Phagen ergibt sich daraus, dass Immunsera auf Bezugs-Phagen des Typus Freeman und auch auf einheimische Phagen, die aus anderen Diphterieherden des Landes stammen (isoliert während der Jahre 1956—1959) keine neutralisierende Wirkung ausübten.

— Die Koexistenz — „beim gleichen Stamm", von lysogenen und lysosensiblen Klonen einerseits und die Freisetzung von „U.P." und „D.P."-Phagen, die auf lysosensible Schwesterklone einwirken (aus der gleichen Bakterienbevölkerung), andererseits, erklärt vielleicht die Verbreitung und Erhaltung dieses virulenten und lysogenen Stammes in der Gemeinschaft „Lhi" und in anderen vier benachbarten Gemeinschaften.

Die Ergebnisse der ersten Untersuchungen über die lysogenisierenden Eigenschaften der „Lhi"-Phagen gegenüber einer Reihe von atypischen Stämmen von. *C. diphtheriae* sind auch hinsichtlich des Induktionsprozesses der Variationsformen unter der Einwirkung von Diphtheriephagen von ganz besonderem Interesse.

THE PECULIARITIES OF "PHAGE-BACTERIUM ECOSYSTEMS" IN THE STRAINS OF *CORYNAEBACTERIUM DIPHTHERIAE, GRAVIS* TYPE ISOLATED FROM AN EPIDEMIC FOCUS

SUMMARY

The investigations concern "a local epidemic type of C. diphtheriae" belonging to the toxigenic gravis type. This type is characterized by the coexistence of a double system of clones: 60 per cent lysogenic, and 40 per cent lysosensitive. Thirty-four strains were isolated from patients and 84 from contacts in the "Lhi" focus. A series of similar strains have been isolated from other communities in the same area during a period of 5—6 months, from October 1950 to April 1960.

Detailed investigations were carried out regarding some of these local strains, e.g. the "strain 951" which is similar in every respect to the other strains isolated from the focus.

The following findings were made:

— These strains are spontaneously releasing two types of "Lhi" phage, i.e. "OP" phage (opaque plaque) and "C.P." phage (clear plaque) *whose lytic and lysogenicity-inducing activities are exclusively exerted on the gravis strains of the "Lhi" focus and of the foci* F.A.D.O.

— The lytic action on the lysosensitive autochtonous strains of the FREEMAN type and of the reference strains of the FREEMAN and WARSAW type is nil. The strain FREEMAN 1180 forms an exception; its susceptibility to the "Lhi" phage was acquired after 20 blind pasages.

— The strictly *specific* antigenicity of the "Lhi" phage is demonstrated by the inability of immune sera to neutralize the Freeman reference phages and the autochthonous phages originating in various other diphtheria foci of the country (strains isolated in 1956—1959).

— The coexistence "in the same strain" of lysogenic and lysosensitive clones on the one hand, and the release of "O.P." and "C.P." phages which are active on lysosensitive sister clones from the same bacterial population, on the other, might account for the spread and persistence of this lysogenic and virulent strain in the community "Lhi" and in another 4 neighbouring communities.

The results of the first investigations concerning the lysogenicity-inducing activity of "Lhi" phages in a series of atypical strains of *C. diphtheria* are also of particular interest as regards the process of induction of variants due to diphtheric phages.

LA GÉNÉTIQUE DE LA SPOROGENÈSE CHEZ *B. ANTHRACIS*

NOTE I. EXISTE-T-IL DES RACES GÉNÉTIQUEMENT ASPOROGÈNES?

par

N. STAMATIN

(Travail du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 18 janvier 1960 —

CHAMBERLAND et ROUX (1883) ont été les premiers à signaler l'existence de races asporogènes de *B. anthracis*. Plus tard, d'autres chercheurs (LEHMAN 1887, BEHRING 1889) trouvent de telles races dans les cultures de ce bacille, habituellement sporogène, c'est-à-dire apte à former des spores dans des conditions déterminées de végétation. Ces conditions ont été antérieurement précisées, surtout par PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX (1881) à l'occasion des recherches faites sur l'atténuation de ce germe. En 1890, ROUX revient au problème de l'asporogenèse de *B. anthracis*, qu'il trouve important non seulement au point de vue pratique, mais aussi au point de vue théorique. En effet, l'auteur, à la suite de nombreux essais négatifs — passages sur animaux, culture dans l'humeur aqueuse de l'oeil de lapin, etc. — conclut: « Il ne s'agit pas d'une modification passagère du bacillus anthracis, mais bien d'un changement permanent, héréditaire, et nous ne connaissons jusqu'ici aucun moyen de rendre aux bacilles modifiés l'aptitude de former de nouveau des spores», Les variantes qu'il a obtenu par cultures des souches sporogènes en bouillon additionné de 1 p 2000 bichromate de potassium ou d'acide phénique 0,2 à 1 p. 1000 « ont perdu, écrit-il plus loin, d'une façon définitive, la faculté de créer des spores ». Dans le même ouvrage, on trouve encore cette phrase: « Ces bactéries asporogènes nous donnent un nouvel et très intéressant exemple des modifications permanentes héréditaires, que l'on peut faire subir aux microbes ».

CHAMBERLAND et ROUX (1883), ROUX (1890), ainsi que BEHRING (1889) pour obtenir des races asporogènes, ont utilisé des milieux de culture auxquels ils ont additionné certaines substances à action dépressive (bichromate de potassium, acide phénique, acide rosolique, etc.). ROUX (1890), en citant LEHMAN (1887), qui a obtenu une telle variante sans recourir à une substance nocive quelconque, a considéré que ces substances ne semblent pas avoir un rôle décisif dans le procès de transformation des germes sporogènes en germes asporogènes, ces derniers pouvant apparaître aussi par un procès physiologique. Cette hypothèse a été pleinement confirmée par les travaux de PREISZ (1904), EISENBERG (1912—1914), BORDET et RENAUX (1930), STAMATIN (1934, 1935). Ces auteurs ont démontré qu'une culture de *B. anthracis* contient, en ce qui concerne la

sporogenèse, une population mixte composée de germes sporogènes et de germes peu sporogènes (PREISZ, 1904) où même totalement asporogènes (BORDET et RENAUX, 1930), ces derniers pouvant être isolés par sélection (EISENBERG, 1912—1914). PREISZ (1904), BORDET et RENAUX (1930), STAMATIN (1934—1935) ont établi que ces germes asporogènes, présents dans les cultures, ont leur origine dans les colonies-boutons apparaissant sur la surface des cultures sporogènes. Ces colonies-boutons constituent donc le lieu où se forment les bacilles asporogènes. Le mécanisme de l'apparition de ces derniers n'est pas connu, mais nous supposons qu'ils sont le résultat d'un mode de multiplication autre que la division directe. En effet, dans les cultures de *B. anthracis* on trouve assez souvent des formes grandes, ovoïdes, comparables aux formes globuleuses L décrites chez différentes espèces bactériennes par KLIENEBERGER-NOBEL, (1951), DIENES et coll. (1951), NESTOR (1957). A l'intérieur des formes globuleuses comme nous l'avons montré dès 1934, on trouve des granules fins et assez nombreux. On peut admettre que ces granules sont le résultat d'une division nucléaire et que chaque granule peut donner naissance à un bacille. La présence dans les colonies filles, d'une extraordinaire variété d'aspects morphologiques, confirme cette hypothèse, les différentes formes représentant les formes de passage du granule au bacille. Revenant aux granules qui résultent de la division de la matière nucléaire de la forme globuleuse, il faut dire qu'ils ne semblent pas être identiques, au point de vue génétique; car les uns, comme nous l'avons déjà dit, donnent des bacilles qui peuvent sporuler, d'autres des bacilles dépourvus partiellement ou peut-être totalement de cette propriété. Cette différence de structure génétique explique l'apparition, dans les cultures sur gélose, faites à partir des colonies filles, de deux types de colonies, chaque type étant constitué par des germes différents, en ce qui concerne leur propriété sporogénétique. Ces colonies se distinguent très facilement l'une de l'autre, même par examen microscopique, ainsi que BORDET et RENAUX (1930) l'ont remarqué. De plus, lorsque les colonies de germes asporogènes se développent dans un gazon de germes sporogènes, les premières provoquent autour d'elles, une légère zone lytique. Dans les gazons de la culture sporogène, les colonies de germes asporogènes se distinguent nettement par leur couleur (blanc-jaune) et leur épaisseur (elles constituent une couche de culture beaucoup plus épaisse que les colonies à germes sporogènes).

Les variantes dites asporogènes sont-elles vraiment asporogènes?

Les recherches concernant la transduction phagique de la sporogenèse nous ont obligé à étudier d'une façon détaillée, si les souches dites asporogènes isolées, sont aptes à former ou non des spores.

Matériel et technique. Au cours de nos recherches, nous avons utilisé sept souches virulentes de *B. anthracis* récemment isolées d'animaux morts du charbon

La souche 1398, isolée du cadavre d'un veau, le 11 mai 1957.
La souche 1886, isolée du cadavre d'un porc, le 26 août 1957.
La souche 1891, isolée du cadavre d'un bœuf, le 3 décembre 1957.
La souche 1892, isolée du cadavre d'un bœuf, le 22 février 1958.
La souche 1897, isolée du cadavre d'un bœuf, le 4 avril 1958.
La souche 1898, isolée du cadavre d'un veau, le 28 avril 1958.
La souche 2136, isolée du cadavre d'un porc, le 7 avril 1959.

Toutes les souches ont les caractères typiques de *B. anthracis* et provoquent chez la souris une septicémie mortelle. Dans le sang et les organes, on trouve de nombreux bacilles capsulés.

Milieu de culture. Bouillon peptoné de viande de cheval et gélose préparée avec le même bouillon à pH = 7,4—7,6.

Technique d'isolement des variantes asporogènes. Les bacilles sporogènes sont ensemencés sur la surface de la gélose en boîtes Petri; après une incubation de quelques jours à l'étuve d'abord (24 heures à 37°) et ensuite à la température de la chambre, les colonies-boutons font leur apparition à la surface des colonies primaires.

Pour isoler une variante asporogène, on prélève une colonie-bouton et les germes sont suspendus en bouillon; ensuite on ensemence de cette suspension 1 à 2 boites Petri à gélose, de façon à obtenir des colonies isolées. Sur la surface des boîtes, ainsi ensemencées, apparaissent des colonies qui, par leur aspect macroscopique, surtout après incubation de 3 à 4 jours à l'étuve, peuvent être classées en 2 types: a) colonies transparentes, légèrement bleuâtres, qui s'enlèvent facilement avec l'anse de platine et s'homogénéisent facilement dans l'eau contenant des germes très sporogènes, et b) colonies opaques, jaunâtres qui s'étirent, ainsi que l'expriment Bordet et Renaux (1930) « comme un paquet d'algues qu'on retire de l'eau » et s'homogénéisent difficilement dans l'eau contenant des germes peu sporogènes, au point qu'il est impossible de mettre les spores en évidence par l'examen microscopique. En repiquant les colonies de ce dernier type, on obtient d'emblée ou par quelques opérations de sélection, une souche qui, à l'examen microscopique et par l'épreuve de la résistance au chauffage, se montre dépourvue de spores.

En appliquant cette technique aux souches sporogènes indiquées plus haut, nous avons réussi à isoler de ces dernières, des variantes ne formant pas de spores et qui sont désignées: 1398 T, 1886 A, 1891 A, 1892 A, 1897 A, 1898 A et 2136 A. La souche 1398 T a été isolée au cours du mois de mai 1957 et les autres pendant les mois d'août-septembre 1958, à l'exception de la souche 2136 A, isolée au cours du mois de mai 1959.

Technique pour déterminer l'absence ou la présence de spores dans une culture. L'examen microscopique, ainsi que Roux l'a précisé depuis 1890, ne peut donner que des indications sur l'intensité de la sporogenèse d'une culture, mais ne permet pas de préciser si une culture contient ou non des spores. Pour avoir cette certitude, il faut recourir, toujours d'après Roux, à l'épreuve de la résistance au chauffage. Au cours des recherches qui seront exposées plus loin, nous avons exécuté cette épreuve comme suit: dans des tubes de culture sur gélose, on introduit une quantité de bouillon stérile, suffisante pour couvrir toute la surface ensemencée de la gélose; immédiatement après, ces tubes sont chauffés au bain-marie, pendant 15 à 30 minutes à 65—70°; ensuite les tubes sont passés pour au moins 48 heures à 37°. Après cet intervalle, on examine l'aspect du bouillon; celui-ci reste clair dans les tubes dont la culture s'est stérilisée pendant le chauffage, et qui ne contenaient pas de spores; au contraire, dans la masse du bouillon apparaissent des flocons et surtout un anneau de culture à la surface du milieu, si les spores existaient. Parfois, la culture dans les tubes chauffés se développe assez tard, mais jamais après 10 jours d'observation.

RÉSULTATS.

En utilisant la technique indiquée plus haut, les variantes asporogènes isolées étaient considérées inaptes à former des spores, puisque leurs cultures sur gélose âgées d'au moins quelques jours (5 à 30 jours) ne résistaient pas à l'épreuve du chauffage. D'habitude, on chauffait la culture d'un seul tube sur gélose. Ces souches considérées asporogènes à la suite d'une telle épreuve, étaient ensuite conservées dans le laboratoire et repiquées, en général, de 30 en 30 jours, dans un tube à bouillon et un tube à gélose. Le repiquage a été toujours fait à partir de la culture en bouillon, la culture sur gélose étant chauffée pour le contrôle de la sporogenèse. En procédant de cette manière, nous avons pu constater que la culture sur gélose de la souche 1891 A a été stérilisable pendant trois mois, mais, après cet intervalle, elle a regagné la propriété qui paraissait perdue.

La souche 1886 A s'est comportée d'une façon similaire, bien que chez cette souche la récupération de la sporogenèse s'est produite plus tard et d'une manière plus discrète. En effet, isolée en août 1958, elle se comporte comme une souche asporogène jusqu'au mois de juin 1959, quand on obtient, par chauffage, une culture sporogène (on a chauffé le 15 juin une culture sur gélose, ensemencée le 8 mai). Jusqu'à cette date, toutes les épreuves concernant la capacité sporogène ont été négatives. De plus, le 10 avril on a chauffé une suspension d'une culture sur gélose de 24 heures contenant 9 milliards de germes. Cette suspension a été stérilisée par le chauffage habituel, prouvant l'absence de spores. Nous assistons donc ici à la réapparition d'un caractère qui paraissait définitivement perdu. La souche 1886 A a continué à être entretenue dans le laboratoire. En juillet, on a effectué l'épreuve de la présence des spores pour la culture sur gélose, faite au mois de juin, qui a été négative; les épreuves des mois d'août, septembre et octobre 1959 ont été de nouveau positives. Donc, on constate chez cette souche la tendance nette de revenir à la forme sporogénétique.

Les souches 1892 A et 2136 A se sont comportées presque de la même manière que la souche 1886 A.

Chez les souches 1938 T, 1897 A et 1898 A on n'a jamais trouvé de spores, par les épreuves faites chaque mois, néanmoins ces souches ne sont pas totalement asporogènes, c'est-à-dire inaptes à former des spores. En effet, en observant de très près ces souches, nous avons constaté que même chez celles-ci la propriété sporogénétique persiste encore, mais pour mettre en évidence cette propriété, il faudrait examiner un nombre plus grand de germes. Par exemple, pour les souches 1897 A et 1898 A, la proportion des cellules aptes à former des spores a été, au cours du mois de novembre 1959 (15 mois après avoir été isolées) de 1 pour 75 milliards. Pour la souche 1398 T, cette proportion est encore plus réduite. On ne trouve que deux cultures résistantes au chauffage parmi 120 cultures sur gélose, soumises à cette épreuve, soit une cellule sporogène pour 180 milliards [1]).

Il faut ajouter que les deux cultures sporogènes isolées de la souche asporogène 1398 T ont été minutieusement examinées quant à leur appartenance. Elles appartiennent par tous leurs caractères (aspect des cultures, pathogénité pour les animaux, sensibilité au phage) au *B. anthracis*. De plus, elles ont la même

[1]) Pour arriver à ces chiffres, nous avons admis, ce qui est d'ailleurs fort probable, que dans un tube à résultat positif il n'existe qu'une seule spore. En calculant, nous avons établi qu'une culture sur gélose contient au moins 3 milliards de cellules.

pathogénité pour la souris que la souche 1398 T d'origine. Toutes ces souches tuent difficilement la souris, mais dans l'animal mort (sang, rate) on trouve de nombreux bacilles capsulés, typiques pour cette espèce, et qu'on ne trouve jamais chez les souris mortes à la suite de l'inoculation de *B. cereus*, germe le plus rapproché de *B. anthracis*.

Les cellules de cette souche de *B. anthracis*, qui paraissaient asporogènes, conservent donc dans leur « mémoire » la technique et dans leur substance le matériel et les outils avec lesquels elles peuvent former des spores. Peuvent-elles perdre à jamais cette mémoire, ce matériel et ces outils? On ne saurait encore répondre à cette question qui est, il faut le dire, bien difficile à résoudre.

CONCLUSIONS.

1. Les colonies filles, développées à la surface des cultures primaires et sporogènes de *B. anthracis* contiennent, à côté des cellules à sporogenèse normale, des bacilles qui ne forment qu'exceptionnellement des spores, et qui ont été considérés génétiquement asporogènes, c'est-à-dire complètement dépourvus de la propriété de former des spores.

2. Nous avons isolé, par sélection et en partant du matériel contenu par les colonies filles, de 7 souches sporogènes, 7 variantes asporogènes de *B. anthracis*, dont les cultures sur gélose, âgées de quelques jours, étaient stérilisées, au moment de l'isolement et même quelques mois plus tard, par chauffage d'une demi-heure à 65—70°.

3. Les sept variantes qui paraissaient asporogènes, ont été régulièrement et à divers intervalles, examinées, quant à leur pouvoir sporogénétique, en constatant que toutes conservent leur faculté sporogénétique.

Quelques-unes de ces variantes reviennent à la forme sporogénétique normale après 2 à 3 mois de conservation au laboratoire; d'autres plus tard, mais toutes forment des spores. La proportion de cellules aptes à former des spores dans une certaine période varie d'ailleurs d'une souche à l'autre. Par exemple, pour la souche 1398 T, la proportion des cellules aptes à former des spores dans une certaine période de son évolution, a été de 1. p. 180 milliards, pour les souches 1897 A et 1893 A de 1 pour 75 milliards, etc.

4. Dans ces conditions, on ne peut pas affirmer que les variantes de *B. anthracis*, que nous avons examinées, sont génétiquement asporogènes, c'est-à-dire totalement inaptes à former des spores.

5. On ne saurait encore expliquer la conservation de la capacité sporogénétique à travers des milliers et des milliers de générations, et son apparition, à un moment donné, dans une cellule. Nous discuterons encore ce problème à la fin de la deuxième note, mais il paraît que le facteur de la sporogénité peut être masqué dans certaines cellules ou, ce qui revient au même, est empêché de se manifester, par des facteurs anti-sporogénétiques, présents dans les cellules.

BIBLIOGRAPHIE

1. Behring E. — Ztschrft. f. Hyg., 1889, **7**, 171
2. Bordet J. et Renaux E. — Ann. Inst. Pasteur, 1930, **43**, 1.
3. Chamberland Ch. et Roux E. — C.R. Ac. Sci., 1883, **94**, 1090
4. Dienes L. et coll. — Bact. Rev., 1951, **15**, 245.

5. Eisenberg Ph. — Zbl. f. Bakt., Orig., 1912, **63**, 30 et 1914, **73**, 81
6. Lehmann B.K. — Münch. Med. Wschrft. 1887, **34**, 485.
7. Pasteur L., Chamberland Ch. et Roux E. — C.R. Ac. Sci., 1881, **92**, 429.
8. Preisz H. — Zbl. f. Bakt., Orig., 1904, **35**, 280 et 416.
9. Roux E. — Ann. Inst. Pasteur, 1890, **4**, 25.
10. Stamatin N. — Arh. Vet., 1934, **62**, 1 et 1935, **27**, 1.

ГЕНЕТИКА СПОРООБРАЗОВАНИЯ У *B. anthracis*

СООБЩЕНИЕ 1-ОЕ. — БЫВАЮТ — ЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИ АСПОРОГЕННЫЕ РАСЫ?

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Дочерние коллонии, развивающиеся на поверхности первичных, спорообразующих культур сибиреязвенной палочки содержат наряду с клетками с нормальным спорообразованием, палочки образующие споры только в виде исключения, считаевшиеся генетически аспорогенными, то есть совершенно лишенными способности образовывать споры.

2. Путем селекции материала, содержащегося в дочерних коллониях, спорогенных штаммов выделены 7 аспорогенных вариантов сибиреязвенной палочки; культуры данных вариантов на агаре, выращенные в течении нескольких суток, подвергались стерилизации тотчас-же после выделения и на несколько месяцев позже, путем прогревания при 65—70°.

3. Все 7 вариантов, казавшихся аспорогенными, систематически исследовались на спорогенные своейтва после истечения разных сроков. Установлено, что все варианты сохранили способность к спорообразованию.

Некоторые из этих вариантов возвращаются к нормальной спорообразующей форме после 2—3 месяцев сохранения в лабораторных условиях, другие — позже, однако, все образуют споры. Причем количество клеток, способных образовать споры, находится в зависимости от каждого штамма. Например, для штамма 1398 Т количество клеток, способных образовать споры, в определенном периоде развития, развнялось от 1 до 180 — милиардов, для штаммов 1897 А и 1898 А — от 1 до 75 милиардов, и т.д.

4. В данных условиях нет основания утверждать, что исследуемые варианты сибиреязвенной палочки генетически аспорогенны, то есть совершенно неспособны образовать споры.

5. Мы еще не в состоянии объяснить сохранение способности к спорообразованию в течения многих тысяч поколений и внезапное появление данной способности в определенной клетке. Этот вопрос будет обсуждаться в другом сообщении; очевидно фактор спорообразования может находиться в скрытом виде в определенных клетках, или же присутствие в клетках антиспорообразующих факторов препятствует появлению действия спорообразующего фактора.

DIE GENETIK DER SPORENBILDUNG BEI *B. ANTHRACIS.*

MITTEILUNG I.—GIBT ES RASSEN DIE AUF GENETISCHER GRUNDLAGE KEINE SPOREN BILDEN?

ZUSAMMENFASSUNG

1) Tochterkolonien, die sich auf der Oberfläche primärer, sporenbildender Kulturen von *B. anthracis* entwickeln, enthalten, neben Zellen mit normaler Sporenbildung, auch Bazillen, die nur ausnahmsweise Sporen bilden und als genetisch nicht sporogen angesehen wurden, d.h. als vollkommen unfähig Sporen zu bilden.

2) Von dem in Tochterkolonien enthaltenen Material ausgehend, wurden aus 7 sporenbildenden Stämmen, 7 nicht sporogene Varianten von *B. anthracis*, durch Selektion isoliert, die in einige Tage alten Agarkulturen, im Augenblick ihrer Isolierung und auch einige Monate später, durch Erwärmung an 65—70°C sterilisiert werden konnten.

3) Diese 7, der Sporenbildung scheinbar unfähigen Varianten wurden regelmässig, in bestimmten Zeitabständen, auf ihre Fähigkeit Sporen zu bilden untersucht, wobei festgestellt wurde, dass alle Varianten die Fähigkeit Sporen zu bilden bewahrt hatten.

Bei einigen dieser Varianten findet die Rückwandlung zur sporenbildenden Form nach 2—3 Monaten, bei anderen später statt, aber alle bilden Sporen. Im übrigen, schwankt die

Zahl sporogener Zellen von einem Stamm zum anderen. Zum Beispiel betrug beim Stamm 1398 T das Verhältnis von sporenbildenden zu nicht sporogenen Zellen, in einem bestimmten Augenblick der Entwicklung, 1:180 Milliarden, bei den Stämmen 1897 A und 1898 A, 1:75 Milliarden, etc.

4) Unter diesen Umständen wäre es unstatthaft zu behaupten, dass die untersuchten Stämme von *B. anthracis* genetisch asporogen, d.h. vollkommen unfähig sind Sporen zu bilden.

5) Wir besitzen noch keine Erklärung für die Erhaltung der Fähigkeit Sporen zu bilden durch tausende von Generationen und für ihr Auftreten in einer Zelle, in einem bestimmten Augenblick. Diese Frage soll in einer zweiten Mitteilung behandelt werden, doch scheint es, dass der für die Sporenbildung verantwortliche Faktor in gewissen Zellen larviert sein kann, oder, was auf dasselbe hinausläuft, dass er durch die in den Zellen vorhandenen anti-sporogenetischen Faktoren verhindert wird sich auszuwirken.

THE GENETICS OF SPORE FORMATION IN *B. ANTHRACIS*

NOTE I. — ARE THERE ANY RACES GENETICALLY INAPT TO FORM SPORES?

SUMMARY

1) Besides cells displaying normal spore formation, daughter colonies developing on the surface of primary sporogenic cultures of *B. anthracis* contain bacilli which will only exceptionally form spores and have therefore been considered to be genetically non-sporing, i.e. totally deprived of the ability to form spores.

2) Starting from the contents of daughter colonies, 7 non-sporing variants of *B. anthracis* have been isolated by selection from 7 spore-forming strains. When cultured on agar for a few days, at the time of their isolation and even several months later, these variants could be sterilized by heating at 65—70°C.

3) At various intervals these seemingly non-sporing 7 variants were regularly tested for spore-forming ability. All of them were found to have maintained the ability to form spores.

Some of these variants revert to the normal sporing form after 2—3 months of maintenance in the laboratory, others at some later moment, but all will eventually form spores. The ratio of spore-forming cells varies from one strain to the other. In strain 1398 T, for instance, the ratio of sporeforming cells, at a certain moment of its evolution, was of 1:180 milliards, in strains 1897 A and 1898 A it was of 1:75 milliards, etc.

4) Under these circumstances it cannot be stated that the investigated variants of *B. anthracis* are genetically non-sporing, i.e. wholly inapt to form spores.

5) We are not, as yet, in a position to explain the persistence of sporing ability through thousands of generations and its appearance in a cell at a certain moment. This problem will be discussed in a second paper, but it appears that the factor responsible for spore formation may be masked in certain cells or, what amounts to the same statement, it may be prevented from manifesting itself by anti-sporogenic factors present in the cells.

LA GÉNÉTIQUE DE LA SPOROGENÈSE CHEZ *B. ANTHRACIS*

NOTE II. LE RÔLE DU PHAGE DANS LA FORMATION DES SPORES CHEZ LES SOUCHES PEU SPOROGÈNES.

par

N. STAMATIN

(Travail du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 18 janvier 1960 —

Dans une note précédente (1959), nous avons montré que les souches de *B. anthracis*, qui sont stérilisables par chauffage, à 70° 15 à 30 minutes et donc asporogènes, au moins au moment où on exécute l'expérience, peuvent devenir sporogènes à la suite de l'action d'un phage spécifique. Nous avons considéré alors qu'il s'agissait d'un processus de transduction — dans le sens que LEDERBERG (1957—1959) a donné à ce mot — c'est-à-dire de l'introduction par le phage, dans la cellule « asporogène », du facteur de la sporogenèse. Examinant de plus près le problème du mécanisme de l'action du phage, ainsi que celui de l'asporogenèse, nous avons découvert des faits qui sont en contradiction avec cette explication. Le premier fait à signaler, qui a été examiné dans la note précédente, est celui que les souches avec lesquelles nous avons travaillé n'étaient pas génétiquement asporogènes. Les autres faits seront exposés dans ce qui suit.

Matériel et méthode. Pour les opérations de transduction, nous avons utilisé 6 souches de *B. anthracis* stérilisables par chauffage, qui ont été décrites dans la première note et différentes souches de phages charbonneux, isolées du sol, surtout le phage E (STAMATIN et LI VAN SOB, 1959), le phage W et gamma, ces deux derniers ayant été reçus par l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » de la part de M-me MCCLOY, pour lesquels nous lui adressons nos plus vifs remerciements.

La technique de la transduction a été déjà décrite dans notre première note. En quelques mots, elle consiste dans la mise en contact sur gélose, des bacilles et du phage. Après 24 heures à 37° et 9 jours à la température du laboratoire, on contrôle la résistance au chauffage des cultures respectives, toujours suivant la technique décrite dans la première note. Les cultures isolées après chauffage, sont examinées du point de vue appartenance d'espèce par inoculations aux souris, examens de la mobilité et sensibilité aux phages spécifiques et parfois aussi pour leur capacité sporogénétique.

RÉSULTATS.

Dans nos premiers essais, nous avons utilisé un nombre réduit de tubes à gélose: on a ensemencé deux tubes; dans un tube on a ajouté le phage, le deuxième étant gardé comme témoin. Dans ces conditions, nous avons obtenu

des résultats positifs (c'est-à-dire la transduction de la sporogenèse) seulement chez trois des six souches étudiées, prises en considération dans cette note, à savoir: 1886 A, 1892 A et 1898 A. Les autres et surtout la souche 1398 T apparaissent, dans ces conditions, insensibles à l'action du phage. Mais en multipliant le nombre des tubes à gélose de 1 à 10, traités de la même manière, nous avons obtenu de nombreuses cultures sporogènes, même de cette souche 1398 T. Nous donnons, dans le tableau I, les résultats d'une série d'expériences effectuées avec cette souche au cours des années 1958 et 1959.

Tableau I

La transduction phagique de la sporogenèse chez la souche 1398 T

Expérience No.	Date de l'expérience	Phage utilisé	Phage multiplié sur la souche de B. anthracis (dernier passage)	Résultats	
				B. anthracis + phage	B. anthracis (témoins)
				Nombre de tubes à résultat positif du total	Nombre de tubes à résultat positif du total
1	23 oct. 1958	W	1398 sporogène	0/1	0/1
2	4 nov. 1958	W	1937 »	0/1	0/1
3	12 nov. 1958	W	1398 »	1/2	0/1
4	12 nov. 1958	E	1937 »	0/2	0/1
5	30 déc. 1958	W	1398 »	1/1	0/1
6	31 jan. 1959	W	1398 »	3/5	1/5
7	1 févr. 1959	E	1937 »	2/5	0/5
8	24 févr. 1959	E	1937 »	1/10	0/19
9	26 févr. 1959	E	1937 »	2/10	0/20
10	20 mars 1959	E	1937 et 1398 sporogène	5/12	0/12
11	6 juil. 1959	E	2008 sporogène	4/10	0/8
12	6 juil. 1959	F	5 passages consécutifs sur 1398 T	9/10	les témoins furent communs avec ceux de l'expérience No. 11
13	21 juil. 1959	F	11 passages consécutifs sur 1398 T	6/11	0/12
14	21 juil. 1959	F	10 passages sur 1398 T et le 11-e sur 2008 sporogène	8/11	les témoins furent communs avec ceux de l'expérience No. 13
15	7 juil. 1959	F_1	11 passages sur 1398 T	0/6	
16	7 juil. 1959	F_3	11 passages sur 1398 T	0/6	
17	7 juil. 1959	F_4	11 passages sur 1398 T	0/6	
18	7 juil. 1959	F_5	11 passages sur 1398 T	0/6	
19	10 juil. 1959	H	7 passages sur 1398 T	4/5	0/5
20	21 juil. 1959	F_5	11 passages sur 1398 T	0/7	
21	21 juil. 1959	F_5	11 passages sur 1398 T	0/7	0/7
22	5 sept. 1959	F	11 passages sur 1398 T	0/8	0/8
23	5 sept. 1959	F_5	11 passages sur 1398 T	0/8	Les témoins furent communs avec ceux de l'expérience No. 22
24	9 sept. 1959	F_5	11 passages sur 1398 T	0/6	1/6
25	9 sept. 1959	F_5	2008 sporogène	0/6	

Tableau I (suite)

Expérience No.	Date de l'expérience	Phage utilisé	Phage multiplié sur la souche de B. anthracis (dernier passage)	Résultats	
				B. anthracis + phage	B. anthracis (témoins)
				Nombre de tubes à résultat positif du total	Nombre de tubes à résultat positif du total
26	4 nov. 1959	E	2008 sporogène	0/3	
27	4 nov. 1959	W	1398 »	0/3	
28	4 nov. 1959	G_{11}	11 passages sur 1398 T	0/3	
29	4 nov. 1959	G_5	5 passages sur 1398 T	0/4	
30	27 nov. 1959	E	2008 sporogène	1/12	0/12
31	27 nov. 1959	W	2008 »	0/12	
32	27 nov. 1959	F	2008 »	0/12	
33	2 déc. 1959	H	1398 T	0/12	0/12

DISCUSSION.

Des données de ce tableau, il résulte d'une manière très nette que le phage intervient dans la transformation d'une souche pratiquement asporogène en souche sporogène [1]).

En effet, de 223 cultures sur gélose, soumises à l'action du phage, 47 ont résisté au chauffage, contenant donc des germes sporogènes, tandis que parmi les 136 cultures similaires, sans phage, deux seulement ont résisté au chauffage (expériences No. 6, No. 24). La différence est importante et le rôle du phage, dans ce processus, incontestable, ceci d'autant plus que sur gélose avec phage, grâce à l'action lytique de celui-ci, le nombre de germes est réduit, même après 10 jours d'incubation. Si on pouvait rapporter ce chiffre au nombre des cellules présentes dans la série de tubes avec phage et dans la série sans phage, le rôle de ce virus serait encore plus évident.

Etant démontré donc et d'une façon indubitable que le phage favorise l'apparition de la propriété sporogénétique, il nous reste à préciser le mécanisme de cette action. Il faut dire dès le début que l'hypothèse du transfert du facteur sporogénétique par le phage, ne peut expliquer, comme nous l'avons déjà dit, les faits que nous avons observés. Ainsi, contre cette hypothèse, nous devons citer d'abord le fait que la souche 1398 T n'est pas génétiquement asporogène. Elle a gardé le facteur de la sporogenèse et des spores apparaissent, très rarement il est vrai, dans ces cultures, même sans l'intervention du phage. En présence

[1]) Les souches sporogènes isolées dans ces conditions, à partir de la souche 1398 T, ont été examinées comparativement, quant à leur pouvoir sporogénétique avec la souche sporogène originelle, à partir de laquelle cette souche 1398 T a été isolée. En comparaison avec la souche originelle, on a constaté que les germes de cultures à sporogénéité induite, ont une intensité sporogénétique beaucoup plus réduite. Par exemple, dans une culture sur gélose inclinée en tube de 16 cm./16 mm. on a compté 18 milliards de spores pour la souche originelle et 1 million seulement pour la souche à sporogénéité ind ite obtenue au cours de l'expérience No. 5. Pour d'autres souches de cette derniére catégorie, l'intensité sporogénétique est encore plus réduite.

du phage, cette apparition s'accentue, ce qui, selon nous, n'est pas en liaison avec une fonction transductrice, mais avec une fonction révélatrice. Le phage relève la présence du facteur sporogénétique dans une cellule, mais « n'apporte » pas ce facteur, ce qui résulte d'ailleurs également du fait que l'action « transductrice » du phage ne s'exerce pas avec régularité sur toutes les cultures. Ce manque de régularité ne peut s'expliquer seulement par des différences concernant les milieux de culture (milieu à base de viande). En effet, on peut constater (du tableau) qu'à partir du mois de juillet 1959 l'activité « transductrice » du phage est de plus en plus faible et que les germes sporogènes n'apparaissent que très rarement, même sous l'influence du phage. Ces résultats s'expliquent d'après nous, par les changements que subissent les cellules bactériennes et leur appareil génétique, au cours de leur conservation dans le laboratoire. Une population microbienne évolue, la structure des individus qui la composent, change. C'est ainsi qu'apparaissent, dans ces cellules, des changements qui rendent le retour à la forme sporogène de plus en plus difficile, même sous l'influence du phage. L'état d'asporogénéité est consolidé dans les cellules, et celles-ci deviennent aptes à se multiplier sans passer par la phase de sporogénéité. Il paraît donc qu'au fur et à mesure qu'on s'éloigne du moment de l'isolement, le retour à la forme sporogénétique devient de plus en plus difficile. Cette affirmation est valable pour la souche 1398 T seulement, les autres souches peu sporogènes, que nous avons étudiées, revenant tôt ou tard — comme nous l'avons d'ailleurs montré dans la première note — à la forme sporogène. L'état d'asporogenèse, pour ces dernières souches, ne peut donc se prolonger à l'infini.

CONCLUSIONS.

1. La capacité des souches peu sporogènes de *B. anthracis* de former des spores s'accentue sous l'influence du phage spécifique. C'est ainsi que parmi 223 cultures sur gélose avec phage examinées, 47 contenaient des spores, tandis que parmi 136 cultures témoins, c'est-à-dire sans phage, on n'en a trouvé que deux.

2. Le phage exerce son action favorisante sur la sporogenèse seulement vis-à-vis des souches peu sporogènes, se trouvant dans une certaine phase de leur évolution, phase qui probablement correspond à certaines conditions physiques et fonctionnelles du facteur sporogénétique dans la cellule bactérienne.

3. L'action favorisante du phage sur la sporogenèse ne semble avoir aucune relation avec le phénomène de transduction. Le phage n'amène pas le facteur de la sporogenèse dans la cellule, qui y existe, mais il facilite l'action de ce facteur en changeant les conditions internes de la cellule de telle manière qu'il peut se manifester, devenir actif, apte à mener les processus enzymatiques à la formation de spores. Le phage trouble profondément l'appareil chromosomien de la cellule bactérienne, ces troubles favorisant parfois l'activité du facteur sporogénétique, souvent masqué chez les souches peu sporogènes de *B. anthracis*. L'action du phage est révélatrice et non transductrice.

4. Il est très probable que les phénomènes de transduction, cités dans la littérature de spécialité, relèvent du même mécanisme, car il est difficile d'admettre qu'une cellule soit apte à intégrer dans son appareil chromosomien n'importe quel facteur génétique. Si les choses avaient pu se passer de cette manière, la différence entre les espèces aurait disparu depuis longtemps.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lederberg I. — Bact. Rev., 1957, **21**, 133.
2. Lederberg I. — Angewandte Chemie, 1959, **71**, 473.
3. Stamatin N. — Ann. Inst. Pasteur, 1959, **96**, 502.
4. Zinder N.D. et Lederberg I. — J. Bact., 1952, **64**, 679.

ГЕНЕТИКА СПОРООБРАЗОВАНИЯ У *B. ANTHRACIS*

СООБЩЕНИЕ II-ОЕ. РОЛЬ ФАГА ПРИ СПОРООБРАЗОВАНИИ СЛАБО СПОРОГЕННЫХ ШТАММОВ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Способность слабо спорогенных штаммов B anthracis, образовать споры усиляется под влиянием специфического фага. Например: среди исследованных 223 культур, выращенных на агаре с бактериофагом, 47 содержали споры, в то время как у 136 контрольных культур, без фага, споры были найдены только у двух

2. Фаг оказывает действие, способствующее спорообразованию только по отношению к слабо спорогенным штаммам, находящимся в определенной фазе зволюции, соответствующей повидимому определенному физическому и функциональному свойству спорообразовательного фактора бактерийной клетки.

3. Действие фага, способствующее спорообразованию, не имеет повидимому какого-либо отношения к явлению трансдукции. Фаг не приносит спорообразовательный фактор в клетку, ибо данный фактор существует в ней, но облегчает действие данного фактора, изменяя внутренние условия клетки в таком направлении, что вышеуказанный фактор может проявлять свое действие, стать активным и способным вести энзиматические процессы к образованию споров. Фаг вызывает глубокие нарушения в экономическом аппарате бактерийной клетки, способствующие деятельности спорогенетического фактора, нередко находящегося в замаскированном состоянии у слабо спорогенных штаммов. Фаг оказывает проявляющее, а не трансдукционное действие.

4. Очень вероятно, что трансдукционные явления, описанные в литературе, зависят от того же самого механизма, ибо трудно допустить, чтобы клетка была способна включать в свой хроомозомный аппарат любой генетический фактор. Если бы это было так, давно-бы исчезли различия между видами бактерий.

DIE GENETIK DER SPORENBILDUNG BEI *B. ANTHRACIS*

MITTEILUNG II. — DIE ROLLE DES PHAGEN IN DER SPORENBILDUNG BEI SCHWACH SPOROGENEN STÄMMEN

ZUSAMMENFASSUNG.

1) Die Fähigkeit schwach sporogener Stämme von *B. anthracis* Sporen zu bilden steigert sich unter der Einwirkung spezifischer Phagen. Zum Beispiel, enthielten von 223 phagenhaltigen Kulturen, die untersucht wurden, 47 Sporen, während in 136 Kontrollekulturen, die keine Phagen enthielten, Sporen nur 2 Mal vorgefunden wurden.

2) Bakteriophagen üben ihre begünstigende Wirkung auf die Sporenbildung nur bei schwach sporogenen Stämmen, die sich in einer bestimmten Phase ihrer Entwicklung befinden aus. Diese Phase entspricht wahrscheinlich einem bestimmten physikalischen und funktionnellen Zustand des sporogenen Faktors in der Bakterienzelle.

3) Die begünstigende Wirkung des Phagen auf die Sporenbildung scheint mit dem Phänomen der Transduktion in keinem Zusammenhang zu stehen. Der Faktor der Sporogenese wird nicht durch Phagen in die Zelle eingeführt, denn er ist in ihr ja vorhanden. Vielmehr wird die Wirkung dieses Faktors durch Phagen insofern begünstigt, als der innere Zustand der Zelle solchermassen verändert wird, dass der Faktor sich auswirken, aktiv werden und die Fähigkeit erlangen kann die enzymatischen Prozesse auf die Sporenbildung hinzulenken. Der oekonomische Apparat der Zelle wird durch Phagen aufs tiefste gestört und diese Störungen begünstigen die Aktivität des sporenbildenden Faktors, der bei schwach sporogenen

Stämmen von *B. anthracis* oftmals larviert ist. Die Wirkung des Phagen ist offenbarend, nicht transduzierend.

4) Es ist sehr wahrscheinlich, dass die in der Fachlitteratur angegebenen Transduktionserscheinungen auf den gleichen Mechanismus zurückzuführen sind, da es schwer fällt anzunehmen die Zelle sei fähig jeden beliebigen genetischen Faktor in ihren Chromosomenapparat aufzunehmen. Lägen die Dinge so, dann wären die Unterschiede zwischen den Bakterienarten längst verschwunden.

THE GENETICS OF SPORE FORMATION IN *B. ANTHRACIS*

NOTE II. — THE PART PLAYED BY THE PHAGE IN SPORE FORMATION BY WEAKLY SPOROGENIC STRAINS.

SUMMARY

1) The ability of weakly sporogenic strains of *B. anthracis* to form spores is enhanced under the influence of the specific phage. Thus, for instance, spores were present in 47 of 223 agar cultures containing phages, while only 2 of 136 control cultures, i.e. without phages, were found to form spores.

2) The phage only exerts its enhancing action on spore formation by weakly sporogenic strains when these strains are in a certain stage of their development. This stage probably corresponds to a certain physical and functional condition of the sporogenetic factor within the cell.

3) The enhancing action of the phage on spore formation does not appear to be in any way related to the transduction phenomenon. The phage does not introduce the spore-forming factor into the cell, since this factor is present in the latter, but it facilitates the action of this factor by changing the internal conditions of the cell in such a way as to enable the factor to manifest itself and become active and apt to direct the enzymatic processes towards spore formation. The phage deeply disturbs the economic apparatus of the bacterial cell and these disturbances enhance the activity of the sporogenetic factor which is often masked in weakly sporing strains of *B. anthracis*. The action of the phage is a revealing not a transducing one.

4) It seems very probable that the phenomena of transduction described in the special literature were due to the same mechanism, the concept of an ability of the cell to include any genetic factor in its chromosomal apparatus being hardly acceptable. If this were the case, the differences between bacterial species would long have disappeared.

LA VALEUR DE LA RADIOPHOTOGRAPHIE APPLIQUÉE À L'ÉTUDE DES ENDÉMO-ÉPIDÉMIES DE FIÈVRE "Q"

NOTE I. OBSERVATIONS RADIOLOGIQUES

par

G. Zarnea, N. Alexandresco, Gr. Angelesco, G. Hodoş, H. Mladin et R. Voicoulesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Rickettsioses et de la Station sanitaire et anti-épidémique (SANEPID) d'Arad

— Manuscrit reçu le 20 juin 1960 —

La radiophotographie (RPH) s'est imposée les 20 dernières années comme une méthode extrêmement utile, étant en même temps objective et très économique pour le dépistage, ainsi que pour l'étude de l'évolution de certaines affections. Limitée initialement au dépistage de la tuberculose pulmonaire, la RPH a été appliquée peu à peu aussi à d'autres domaines de la pathologie (cancers bronchopulmonaires, pneumoconioses, cardiopathies, cervicarthroses, affections jéjunoiléales, néoplasmes gastriques, etc.).

Au cours de l'étude complexe d'un foyer de fièvre « Q », qui a évolué dans une collectivité agro-zootechnique de la région d'Arad pendant les années 1956—1958, on a effectué l'examen pulmonaire, par des RPH répétées, aussi bien chez les malades que chez le reste des habitants de la ferme.

Ces recherches nous ont permis, d'un côté, l'observation du caractère radiologique et l'évolution dynamique des pneumopathies qui accompagnent la fièvre « Q » chez l'homme et, d'un autre côte, d'établir certaines corrélations entre l'apparition de l'image radiologique et les données cliniques, épidémiologiques et de laboratoire.

Pendant longtemps la fièvre « Q » a été considérée comme étant une maladie respiratoire typique du fait que, dans beaucoup de cas, elle est accompagnée par des lésions pulmonaires décelables radiologiquement, similaires aux pneumonies atypiques virotiques (PAV). Néanmoins, la fièvre « Q » étant au fond une maladie de système, ne doit pas être exclusivement considérée comme une pneumopathie, vu que dans 40—50% des cas les modifications radiologiques peuvent être absentes (Lennette (8)), en particulier chez les individus chez qui l'infection se produit par une autre voie que par la voie pulmonaire (Babudieri) (1).

Les descriptions du tableau radiologique de la fièvre « Q » sont discordantes dans la littérature de spécialité et dominées par les aspects observés dans la pneumonie virotique atypique. Sans doute qu'une grande partie du soi-disant polymorphisme radiologique attribué à la fièvre « Q » est due à d'autres causes surajoutées, variant selon l'âge et déterminées par des lésions préexistantes, telles

que: sclérose péribronchique, tramites cicatricielles, bronchectasie, séquelles pleurales ou pneumonies interstitielles concomitantes, ainsi que leurs séquelles.

Ainsi, d'après Moreau (6), l'aspect radiologique de la fièvre « Q » n'aurait pas un aspect pathognomonique et serait comparable à celui présenté par les autres pneumonies atypiques.

Schinz (9) relève dans la fièvre « Q » l'existence d'une forme nodulaire, segmentaire lobaire, unique ou multiple, affectant de préférence les zones périphériques des champs pulmonaires moyens ou inférieurs. Les images n'ont aucun rapport avec les hiles, les infiltrats à opacité prononcée étant plus fréquents que les infiltrats à petites tâches. L'intensité des opacités est variable, allant de l'aspect d'un voile à un aspect d'ombre intense et homogène, avec prédominance des opacités d'intensité sous-moyenne. Dans un nombre restreint de cas on ne peut signaler qu'une accentuation du dessin pulmonaire et très rarement le dessin miliaire des champs pulmonaires. Les ombres peuvent augmenter d'intensité, sans confluer, atteignant des dimensions maxima entre le 6-e et 9-e jour de maladie et disparaissant lentement après 2 à 5 semaines.

Teschendorf (10) souligne l'importance de l'examen radiologique le 2-e jour de maladie, alors que les infiltrats à localisation segmentaire présentent l'aspect d'un « verre mat ».

L'aspect radiologique de la fièvre « Q » a été également décrit par plusieurs auteurs roumains:

Voicoulesco et coll. (11) ont trouvé chez les malades, provenant d'un foyer épidémique — hospitalisés à la clinique de Maladies contagieuses — des modifications radiologiques dans 80% des cas, présentant les aspects suivants:

— Infiltrations de type diffus (peu denses et vaguement contourées) en foyer unique (83%) ou en foyers multiples.

— Formes plus opaques — plus rares — d'intensité faible avec localisation de préférence dans les lobes inférieurs, images lobaires, condensation de type pneumonique ou zonale; au niveau de la condensation on voit, par transparence, des images d'infiltration péribroncho-vasculaires.

En général, les images ont été d'intensité faible, discrète et parfois seul l'examen comparatif symétrique a pu déceler la région affectée.

Les auteurs signalent comme un fait particulièrement important la clarification partielle de l'opacité par scission des foyers en couches, le long des lignes vasculaires, comme résultat du caractère interstitiel de la pneumopathie.

Les foyers ont été observés le 2-e et le 6-e jour de maladie, avec maximum de fréquence le 5-e jour et ont duré pendant quelques jours dans les formes légères de maladie, allant jusqu'à 30—40 jours dans les formes graves.

Combiesco et coll. (4), étudiant une épidémie, mentionnent la présence d'une opacité plus ou moins homogène, d'intensité variable, avec des contours vagues et localisations différentes.

Hincou et coll. (5), insistant sur le rapport entre les images et les hiles, décrivent 3 types d'aspects: aspect de verre mat « ouaté » avec réaction des ganglions hilaires, réactions pleurales, macronodules suspendus et aspect en « pieds de scarabée » ou « cheveux peignés ».

Pascou et coll. (7) insistent sur le caractère prédominant de l'infiltration interstitielle hilifuge accompagnée parfois par l'accentuation du réseau pulmonaire dû à une lympho-hémostase, sans traces cicatricielles réparatoires.

D'autres auteurs mentionnent de grandes ombres d'intensité costale ou sous-costale, à contours irréguliers, toujours en relation avec les hiles et qui sont infiltrées uni-ou bilatéralement. (Meila (2)).

Bien que la majorité des auteurs considèrent que les données radiologiques ne permettent pas de différencier la fièvre « Q » de la PAV, Feinstein et Iacobsohn (cités par Lennette (8)), trouvent l'absence de l'élargissement hilaire et vasculaire qui s'observe dans la majorité des PAV comme caractéristique pour la fièvre « Q ».

De plus, les lésions de la PAV sont constituées par des infiltrats diffus ou en foyer, tandis que dans la fièvre « Q », les infiltrats sont le plus souvent lobaires et segmentaires avec opacités homogènes.

* * *

Nos observations ont été effectuées pendant l'étude complexe d'un foyer de fièvre « Q », qui a évolué en 2 poussées épidémiques, dans une ferme à caractère agro-zootechnique (G.A.S. Utviniș); l'épidémie a provoqué 125 cas humains de fièvre « Q », diagnostiqués sérologiquement par la réaction de fixation du complément (RFC) avec antigène corpusculaire de *Coxiella burnetii*, positive en titre de diagnostic. De ces cas, 63 ont évolué avec des symptômes cliniques évidents, 48 nécessitant l'hospitalisation; 20 des hospitalisés ont présenté des modifications radiologiques.

Soixante-deux autres cas ont eu une évolution complètement asymptomatique, n'étant dépistés que par les examens sérologiques. Le reste des habitants de la ferme (235 personnes indemnes) a été également soumis à l'examen de la RPH.

Parallèlement à la RPH, le collectif de la ferme a été contrôlé par des examens sérologiques, effectués en 4 étapes (avril 1957-juin 1958); de même, les malades internés ou à traitement ambulatoire ont été soumis à des contrôles radiologiques et sérologiques répétés.

Pendant l'épidémie de 1956, des 12 malades confirmés sérologiquement, 11 ont présenté des infiltrats pulmonaires dès les premiers jours de maladie, avec images d'intensité faible, homogènes (aspect de verre mat) de la dimension de la paume d'un adulte, à caractère migratoire et parfois en rapport avec les hiles.

Les observations effectuées pendant l'épidémie de 1957, à l'aide de la RPH chez les malades avec des formes cliniques, internés à l'hôpital, ont montré la présence des suivants aspects radiologiques:

1. Formes lobulaires avec ombres sphériques, discrètes, relativement bien délimitées, homogènes, sans rapport avec les hiles (4 cas). (photos 1 et 2).

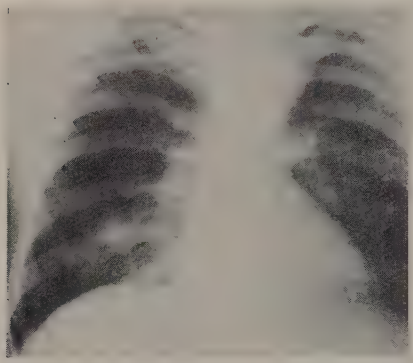
2. Formes zonales à localisation variable, axilaire ou infracardiaque, d'intensité faible (6 cas) Photo 3.

3. Formes réticulo-nodulaires avec aspect marbré miliaire, à localisation infrahilaire gauche ou à la base droite, ressemblant ou pour mieux dire impossible de les différencier des images de la PAV (7 cas). Photos 4 et 5.

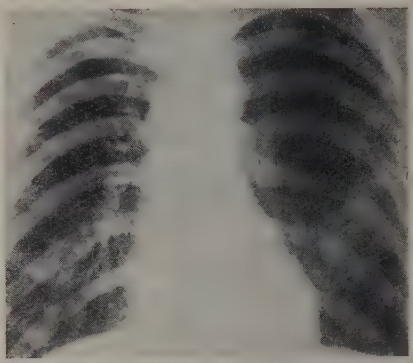
4. Formes lobaires inférieures gauches, avec pleurésie et pleurite consécutive (réactivation tbc. ou complications dues à la fièvre « Q » (?)) (2 cas).

5. Forme broncho-pneumonique avec opacité en foyers étendus, intenses, homogènes, à marges diffuses, à localisation parahilaire droite et dans les champs pulmonaires inférieurs, sans rapport avec la réaction hilaire (1 cas).

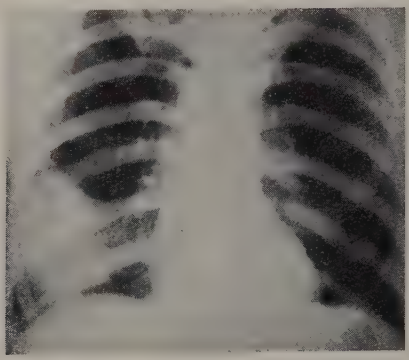
La dimension et l'intensité des infiltrats n'ont eu aucun rapport avec l'état clinique des malades.



Photographie 1. Forme lobulaire (ombre sphérique, de faible intensité dans le champ pulmonaire inférieur droit, sans rapport avec le hile, aspect d'infiltrat virotique).



Photographie 2. Forme lobulaire (ombre ovalaire, de faible intensité, juxta scisurale inférieure gauche, sans rapport avec le hile, aspect d'infiltrat virotique).

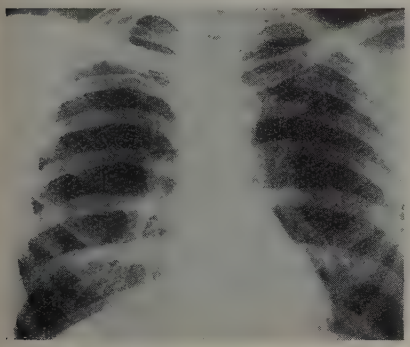


Photographie 3. Ombre pneumonique sphérique située à la base du champ pulmonaire droit, avec aspect de « verre mat », sans réaction du hile. Image typique pour la fièvre « Q » pendant la poussée epidémique.

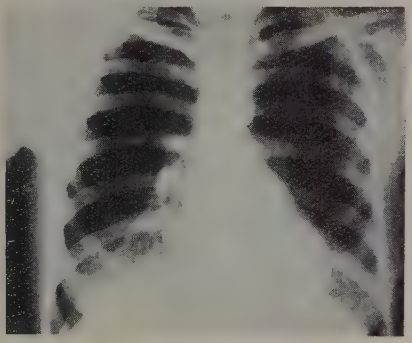
Dans les formes réticulo-nodulaires le tableau radiologique a presque complètement disparu en 10—15 jours, tandis que dans les formes broncho-pneumoniques, zonales ou lobulaires, la résorption a été plus lente, l'image diminuant d'étendue et de tonalité en 45 jours.

L'analyse comparative de la RPH, effectuée après la sortie de l'hôpital avec les RPH antérieures, indique la persistance des scléroses péribronchiques ou des séquelles pleurales, allant parfois jusqu'à une année dans les formes broncho-pneumoniques, zonales ou lobulaires (photos 6, a, b, c).

L'examen RPH des 62 individus qui ont fait l'infection asymptomatique, confirmée sérologiquement comme étant une fièvre « Q », a montré des modifi-



Photographie 4. Aspect réticulo-micronodulaire infrahilaire droit atypique pour la fièvre « Q » chez un cas à évolution asymptomatique avec RFC positive. Image identique à celles de la PAV.



Photographie 5. Image d'infiltrat virotique chez un malade de fièvre « Q », ombre sous-intense, diffuse dans le champ pulmonaire inférieur gauche.

cations radiologiques dans 6 cas: opacité sphérique (3 cas), formes réticulo-nodulaires (2 cas) et forme zonale (1 cas).

L'examen RPH du reste de la population de la ferme (235 personnes indemnes, sérologiquement négatives) a montré dans 61 cas des modifications radiologiques de type scléroses péribronchiques diffuses, systématisées, sclero-emphysème (dû à l'âge avancé), complexes primaires calcifiés, tbc. active fibro-nodulaire, etc. et en plus, dans 8 cas, des modifications suspectes de PAV.

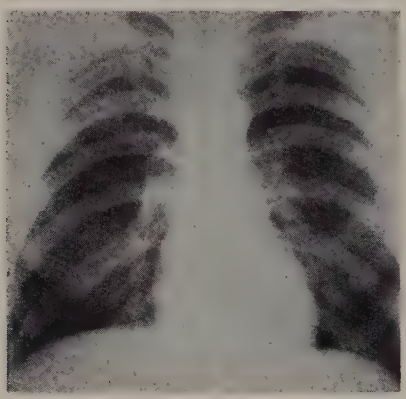
Analysant les résultats obtenus à l'aide de la RPH et l'évolution dynamique des images, on peut considérer caractéristiques pour l'existence d'une pneumopathie déterminée par la *C. burnetii*, les types d'images radiologiques suivants:

— la présence d'une opacité unique ou multiple, à localisation lobaire, segmentaire, située dans les champs pulmonaires moyens ou inférieurs, en général vers la périphérie, sans rapport avec la réaction des ombres hilaires, parfois à forme sphérique ou ovalaire, bien délimitée et homogène, d'intensité faible (surtout si ces modifications sont en concordance avec les autres données cliniques et les conditions épidémiologiques);

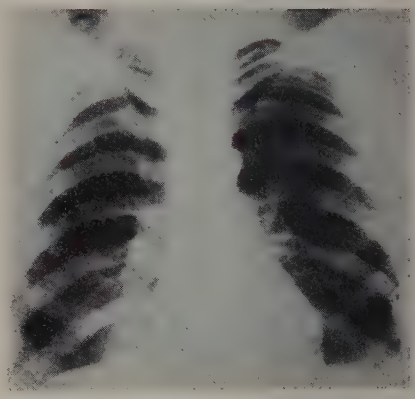
— la présence d'une ombre de faible intensité, localisée à la moitié inférieure des champs pulmonaires, à marges estompées, relativement non-homogène et qui peut augmenter de dimension ou d'intensité et migrer, accompagnée ou non

par l'affectation de la plèvre (ce tableau radiologique peut constituer une étape précédant ou suivant l'image radiologique décrite plus haut);

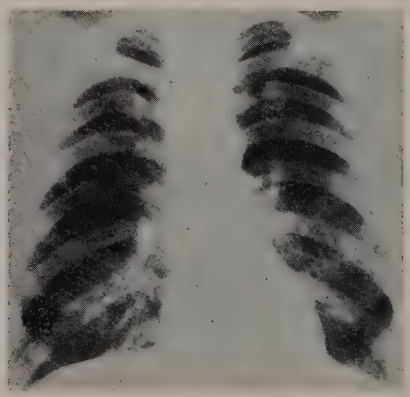
Photographies 6 a, b, c. Cas G. P. Évolution dynamique radiologique



6 a. Examen RPH antérieur à la maladie. 14.IV.1957 — aspect normal.



6 b. Examen RPH le 20.XI.1957. Aspect d'infiltrat virotique infrahilaire droit. RFC pour la fièvre « Q » positive.



6 c. Examen RPH le 18.VI.1958. sclérose péribronchique persistant après 7 mois de la découverte de l'infiltrat rickettsien.

— l'accentuation du dessin péri-bronchique, avec apparition d'un aspect polyédrique ou d'un aspect marbré miliaire (SCHINTZ), disséminé ou avec localisation infra-hilaire, difficile à différencier des images signalées dans la PAV.

Dans les formes de fièvre « Q » sans complications, dues aux infections sur-ajoutées, les images hilaires gardent leur intégrité et leur intensité ainsi que la transparence des espaces cardiohilaires. Nous considérons ce critérium comme étant d'une grande importance pour le diagnostic radiologique de l'image de la fiévre « Q ».

La modification de ces aspects peut s'expliquer par l'existence d'infections bactériennes ou d'un infiltrat virotique surajoutés.

Ces données prouvent que la RPH permet d'établir précocement l'apparition des modifications pulmonaires produites par la fièvre « Q », étant une méthode simple et économique en comparaison avec l'examen radioscopique, qui ne peut fournir des données comparatives objectives et augmente le risque de l'exposition aux radiations pour les médecins et les personnes contrôlées.

Cette méthode est beaucoup plus avantageuse que la radiographie en masse, qui nécessite beaucoup de matériel et de temps.

L'étude de la dynamique des images permet l'interprétation plus correcte, surtout si, dans tous les cas radiologiquement suspects de fiévre « Q », l'examen RPH est corroboré aux données cliniques et de laboratoire.

La difficulté la plus sérieuse pour l'interprétation des images radiologiques de la fièvre « Q » consiste dans la ressemblance avec les images données par la PAV, dues à la similitude et à la possibilité de coexistence de ces deux infections.

L'application systématique de la RPH en tant que méthode d'examen en masse d'une collectivité où évolue une endémo-épidémie de fièvre « Q », permet en plus le dépistage d'images radiologiques chez des individus à infections asymptomatiques, qui peuvent être confirmées plus tard, par la méthode sérologique comme étant une fièvre « Q ».

CONCLUSIONS

Dans le présent travail sont exposés les résultats obtenus par l'application de la radiophotographie pendant l'étude complexe d'un foyer endémo-épidémique de fièvre « Q », qui a évolué dans une ferme à caractère agro-zootechnique sous la forme de 2 poussées épidémiques dans l'intervalle de 1956—1958.

1. On a contrôlé par examens périodiques à intervalle de 6 mois, 360 personnes dont 125 ont présenté des réactions sérologiques positives, indiquant une infection avec *C. burnetii*. De ces personnes, 63 ont fait une maladie accompagnée de symptômes cliniques, pour le reste l'infection évoluant asymptomatiquement.

2. Les lésions pulmonaires, observées au cours de la première poussée épidémique, ont été de type infiltratif, à intensité faible, homogène et aspect de verre mat.

3. Dans la seconde poussée, les formes réticulo-nodulaires ou à aspect marbré, localisées à la base du poumon, ont prédominé, suivies par les formes zonales, lobulaires, lobaires et broncho-pneumoniques.

4. La persistance des images radiologiques a varié entre 2 à 5 semaines, laissant dans certains cas des séquelles. Les lésions zonales ou lobaires se résorbent difficilement, les séquelles pouvant persister pendant des mois.

5. Un critérium important pour le diagnostic radiologique de la fièvre « Q » est représenté par l'intégrité des images (dimensions, intensité) hilaires dans les formes sans complications provoquées par infections sur-ajoutées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Babudieri B. — Série de Monographies, 19, 193, OMS, Genève, 1953.
2. Buşila V., Moisesco I., Pop O., Coucouruz L., Meila I., Kocsis T., Vasilesco I., Alexandresco R. et Vîlceanu M. — Communication Ses. Sc. Méd., 1954 Timişoara.
3. Chisleag G. — Cours de diagnostic radiologique (Roentgen), **1—2**, Iassy, 1958.
4. Combiesco D., Polexe i. et Dimache V. — St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol. şi Parasitol., 1954. **5**, 229.
5. Hincou r., Pascou A. et Constantinesco G. — Méd. Int. 1956. No. 8, 700.
6. Moreau R. — Encyclopédie Méd. Chirurg., 1952/2. C. 30, 6003.
7. Pascou A., Ionesco I., Sileanu I., Bodeanu G. et Companet V. — Rev. Microbiol., Parasitol., Epidemiol., 1957. No. 1. 23.
8. Rivers M. Th. et Horsfall L. F. — Viral and Rickettsial Diseases of man, 1959, 880.
9. Schinz H. R., Baensch W. E., Friedel E. et Wehlinger F. — Lehrbuch der Röntgen Diagnostik, 1952, 2187, ed. 5-e. G. Thieme — Stuttgart.
10. Teschendorf M. — Lehrbuch der Röntgenologischen Differentialdiagnostik, 1958, **1**, 151. Ed. G. Thieme, Stuttgart.
11. Voicoulesco M., Zamfiresco I., Nicolesco N., Rosca M. et Tofan N. — Travaux de la Ses. gén. Sc. Acad. R.P.R., 1950. 1321, Ed. Acad. R.P.R.

ЗНАЧЕНИЕ РАДИОФОТОГРАФИИ, ПРИМЕНЯЕМОЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭНДЕМО-ЭПИДЕМИЙ ЛИХОРАДКИ КУ

I. РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Излагаются результаты, полученные при помощи применения радиофотографии (Р. Ф.) сравнительно с клиническими, эпидемиологическими и лабораторными данными, установленными по случаю комплексного изучения эндемо-эпидемического очага лихорадки Ку, протекавшей в сельско-животноводческом хозяйстве под видом двух эпидемических вспышек в 1956—1958-ом г.

1. Путем повторных обследований каждые 6 месяцев исследовались 360 лиц, из которых у 125 установлены положительные серологические реакции, говорившие за наличие инфекции с *C Burnetii*. Из этих лиц 63 проделали заболевания, сопровождающиеся клиническими симптомами, в то время как у остальных инфекция протекала безсимптомно.

2. В течении первой эпидемической вспышки, легочные изменения были инфильтративного типа, менее интенсивные, чем при воспалении легких, гомогенные как матовое стекло.

3. В течении второй эпидемической вспышки преобладали ретикуло-узелковые формы или формы с мраморопоодобным видом, локализированные на основании, наряду с зональными, долечковыми, долевыми или бронхопневмоническими формами.

4. Продолжительность рентгенологических изменений колебалась между 2-мя и 5-ю неделями, причем в некоторых случаях оставались последствия. Зональные или долевые поражения труднее рассасываются, сохраняясь иногда месяцами.

5. Большое значение для рентгенологической диагностики Ку лихорадки представляет сохранение величины и интенсивности изображений пучковых областей, при формах, не осложняющихся другими инфекциями.

DER WERT DER RÖNTGENPHOTOGRAPHIE BEIM STUDIUM DES ENDEMO-EPIDEMISCHEN Q-FIEBERS

I. RÖNTGENOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über die Ergebnisse berichtet, die durch die Anwendung der Röntgenphotographie im Vergleich mit den klinischen, epidemiologischen und Laboratoriumsergebnissen, bei der komplexen Untersuchung eines endemisch-epidemischen Herdes von Q-Fieber erzielt wurden. Die Erkrankungen traten in einer agrozootechnischen Wirtschaftseinheit, in der Form von 2 epidemischen Ausbrüchen, während der Zeitspanne 1956—1958 auf.

1. Es wurden 360 Personen, in Abständen von 6 Monaten periodisch untersucht. Davon wiesen 125 serologische Reaktionen auf, die auf die Anwesenheit einer Infektion mit *C. burnetii* hindeuteten. Dreiundsechzig dieser Personen wiesen die klinischen Symptome der Erkraung auf, während bei den anderen die Infektionstumm verlief.

2. Beim ersten epidemischen Ausbruch bestanden die Lungenschädigungen in Infiltraten. Die Verschattungen waren etwas schwächer als bei Lungenentzündung, homogen, mattglassartig.

3. Beim zweiten epidemischen Ausbruch herrschten retikulonduläre Formen oder marmorierte Bilder an der Lungenbasis vor. Daneben traten zonenförmige, lobuläre, lobäre oder bronchopneumonische Formen auf.

4. Die Röntgenbilder erhielten sich 2—5 Wochen. In manchen Fällen blieben dauernde Schäden zurück. Zonale oder lobäre Schäden werden schwerer resorbiert und die Folgerscheinungen können monatelang bestehen bleiben.

5. Ein wichtiges Merkmal für die Röntgendiagnose des Q-Fiebers ist die unveränderte Ausdehnung und Intensität der Hilusbilder bei Formen die nicht durchinzutretende Infektionen kompliziert werden.

THE VALUE OF RADIOGRAPHY AS APPLIED TO THE STUDY OF Q-FEVER ENDEMO-EPIDEMICS

I. RADIOLOGICAL OBSERVATIONS

SUMMARY

The results of radiophotography as compared to those of clinical, epidemiological and laboratory investigations during the complex study of an endemo-epidemic Q-fever focus are reported in the present paper. The disease developed in an agrozootechnical farm, in the shape of two epidemic outbursts during the period 1956—1958.

1. A number of 360 persons were investigated by periodical examinations at intervals of 6 months. Out of these, 125 displayed positive serological reactions demonstrating the presence of an infection with *C. burnetii*. Sixty-three of these subjects exhibited clinical symptoms of the disease while in the remainder the infection was silent.

2. During the first epidemic outbreak, the pulmonary lesions were of the infiltrative type, the radiological pattern consisting of homogeneous shadows of subpneumonic intensity (opaque glass).

3. During the second epidemic outbreak, reticulonodular forms of marmoreal patterns situated at the bases prevailed together with zonal, lobular, lobar or bronchopneumonic forms.

4. The radiological images persisted for 2—5 weeks leaving sequelae in some cases. Zonal or lobar lesions are more slowly resorbed and the sequelae may persist for several months.

5. An important criterion for the radiological diagnosis of Q-fever consists in the maintenance of the integrity of the extent and intensity of the hilar pattern, as long as the disease is not complicated by other infections.

LA VALEUR DE LA RADIOPHOTOGRAPHIE APPLIQUÉE À L'ÉTUDE DES ENDÉMO-ÉPIDÉMIES DE FIÈVRE « Q ».

NOTE II. CORRÉLATIONS CLINICO-ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET DE LABORATOIRE

par

G. Zarnea, N. Alexandresco, Gr. Angelesco, R. Voicoulesco, Honorina Ionesco et N. Krausz

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Rickettsioses et de la Station sanitaire anti-épidémique (SANEPID) d'Arad

— Manuscrit reçu le 8 juillet 1960 —

L'étude de la dynamique des images obtenues par radiophotographie (RPH) et leur corrélation avec l'évolution clinique et l'examen sérologique, par la réaction de fixation du complément (RFC) avec antigène corpusculaire de *Coxiella burnetii*, a été effectuée sur 25 malades qui ont présenté avant la maladie des images pulmonaires normales. L'évolution de l'aspect radiologique et des éventuelles séquelles chez ces malades a été poursuivie pendant 640 jours à partir du début de la maladie (6).

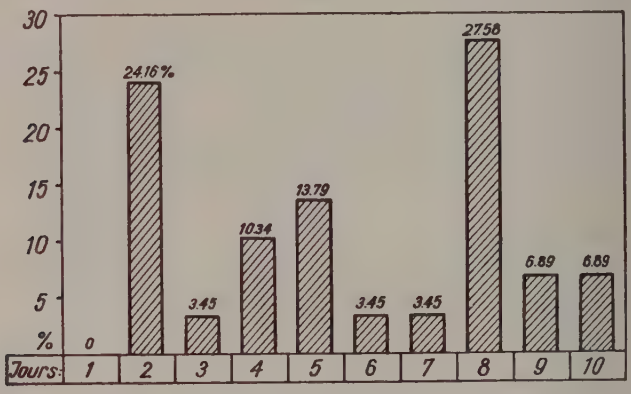
Les modifications radiologiques ont été observées: dans 40,31% des cas à partir du 1-er au 10-e jour, dans 19,44% — entre le 10-e et le 20-e jour, dans 11,11% — entre le 20-e et le 30-e jour et dans 29,14% — entre le 30-e et le 640-e jour du début de la maladie. Le pourcentage, beaucoup plus élevé, d'images radiologiques positives, constaté les premiers 10 jours, prouve l'importance et la valeur de cet examen pour le diagnostic, dans les cas suspects de fièvre « Q », surtout que dans 24,16% des cas les modifications ont été présentes dès le 2-e jour de maladie (graphique 1).

L'étude comparative de la dynamique des anticorps, effectuée à l'aide de la RFC avec l'antigène *C. burnetii* les premiers 30 jours de maladie, a montré une RFC positive seulement dans 13,95% des cas, dans les premiers 10 jours, dont 83,33% à peine le 7-e jour, l'examen sérologique positif le plus précoce étant enregistré le 4-e jour de maladie. Dans la seconde décade de la maladie, la RFC devient positive dans 23,24% des cas, pour augmenter, à la troisième décade, à 62,81%.

Le graphique 2 montre comparativement la fréquence procentuelle des modifications pulmonaires dépistées par RPH et l'apparition des RFC positives, dans les premiers 30 jours du début de la maladie (graphique 2).

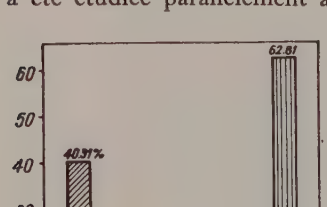
On observe que la fréquence des modifications radiologiques est au maximum dans la première décade, diminuant progressivement dans la seconde et la troisième, tandis que les RFC positives ont une évolution en sens inverse, leur fréquence atteignant le maximum à la fin de la troisième décade.

Ces données montrent que l'examen sérologique confirme, en général, les indications ou les suspicions fournies parfois par l'examen radiologique seulement dans la troisième décade du début clinique de la fièvre « Q ».



Graphique 1

Afin d'illustrer les corrélations qui existent entre les examens radiophotographiques et sérologiques, nous relatons 5 observations, correspondant aux variantes les plus caractéristiques des images radiologiques, dont la dynamique a été étudiée parallèlement à celle des RFC.



Graphique 2

— Le malade D.F., de 26 ans, avec image pulmonaire normale avant la maladie, a présenté ultérieurement une pneumopathie rickettsienne de type réticulo-nodulaire, ressemblant à la pneumonie atypique virotique (PAV), avec évolution de courte durée, sans séquelles. *Examen radiologique*: image modifiée dès le 2-e jour de maladie, qui diminue le 5-e pour revenir au normal après 5 mois. *Examen sérologique*: négatif les premiers jours, positif le 18-e (titre 1:32) et après 2 mois (titre 1:64), diminue lentement et se maintient au titre de 1:8, même après une année (image 1).

— Le malade B.T., de 45 ans, avec image pulmonaire normale et RFC négative avant la maladie, a présenté ultérieurement une fièvre « Q » avec lésions pulmonaires de forme lobaire à évolution longue, intéressant la plèvre et des séquelles fibreuses persistant pendant des mois. *Examen radiologique*: lésions caractéristiques le 4-e et le 9-e jour de maladie. *Examen sérologique*: positif le 20-e jour — titre 1:32 augmentant ensuite à 1:128 et diminuant pour se maintenir au titre de 1:64 après 6 mois (image 2).

Image 1

Début clinique	Dynamique de l'image radiologique (RPh)	Tableau radiologique (maximum d'intensité)	Examen sérologique (RFC)	Observations
21.VI. 1957	24.IV.1957: image pulmonaire normale 22.VI.1957: voile infrahilaire droit d'intensité faible, non homogène, à contours diffus 26.VI.1957: image d'intensité et étendue réduites: micro-nodules d'intensité faible et dessin péribronchique accentué 25.XI.1957: image pulmonaire normale 15. I.1958: image pulmonaire normale 18.VI.1958: image pulmonaire normale		C.IV.1957 = négatif 24.VI.1957 = négatif 12.VII.1957 = 1:32 6.IX.1957 = 1:64 26.IX.1957 = 1:32 26.XI.1957 = 1:32 10. I.1958 = 1:16 18.VI.1958 = 1: 8	Forme réticulo-nodulaire (comme dans la PAV), à évolution rapide, sans séquelles

Image 2

Début clinique	Dynamique de l'image radiologique (RPh)	Tableau radiologique (maximum d'intensité)	Examen sérologique (RFC)	Observations
7.V. 1957	16.IV.1957: image pulmonaire normale 11.V.1957: image estompée circulaire paracardiaque gauche inférieure, de la dimension d'une mandarine, d'intensité faible, nettement contourée. 18.V.1957: dessin péribronchique infrahilaire bilatéral, plus intense. 27.V.1957: sclérose hilaire et infrahilaire bilatérale avec adhérences pleuro-diaphragmatiques à droite. 30. V.1957: même aspect. 6.VI.1957: dessin péribronchique infrahilaire droit, accentué. 14.XI.1957: sclérose hilaire et infrahilaire droite avec aspect réticulaire.		C.16.IV.1937 = négatif. 11.V.1957 = négatif. 16.V.1957 = négatif. 27.V.1957 = 1: 32 12.VIII.1957 = 1: 128 6.IX.1957 = 1: 64 14.XI.1957 = 1: 64	forme lobulaire à évolution prolongée intéressant la plèvre et séquelles fibreuses persistant pendant des mois.

Image 3

Début clinique	Dynamique de l'image radiologique (RPh)	Tableau-radioscopique (maximum d'intensité)	Examen sérologique (RFC)	Observations
16.V. 1957	10.IV.1957: macronodules superintenses para-et infrahilaires droits. Scléro-emphysème pulmonaire. 17. V.1957: voile pneumonique, de la dimension d'une paume d'adulte, sans topographie zonale; voile de faible intensité à la base droite dans l'angle cardiophrénique gauche et rétrocardiaque. Nodules parahilaires droits calcifiés. 23. V.1957: mêmes images, d'intensité et étendue plus accentuée. 27. V.1957: même aspect. 10.VI.1957: voile micro- et macronodulaire, non-homogène, dans le tiers inférieur du poumon droit. Voile discret non-homogène dans l'angle cardiophrénique gauche.		C.3.V.1957 = négatif 18.V.1957 = négatif 16.VI.1957 = 1:64 12.VII.1957 = 1:256	Forme broncho-pneumonique grave, à évolution de longue durée avec séquelles pulmonaires. Le malade ayant quitté la ferme, n'a plus été observé.

Image 4

Début clinique	Dynamique de l'image radiologique (RPh)	Tableau radiologique (maximum d'intensité)	Examen sérologique (RFC)	Observations
15.IV. 1956	25.IV.1956: opacité discrète parahilaire gauche, avec contour diffus, de la dimension d'une orange 10. V.1956: opacité d'aspect liquidien, occupant le tiers inférieur de l'hémithorax gauche 18. V.1956: épaississement pleural à la base de l'hémithorax gauche 25.IV.1957: image pulmonaire normale		20.IV.1956 = 1:16 26.IV.1956 = 1:16 25.IV.1957 = 1:64	Forme lobulaire compliquée de pleurésie, sans séquelles. Le malade ayant quitté la ferme n'a plus été observé.

— Le malade J.V., de 52 ans, avec données radiologiques et sérologiques antérieures inconnues, a présenté une forme broncho-pneumonique grave, à évolution longue et séquelles pulmonaires. *Examen radiologique*: modifications dès les premiers jours de maladie. *Examen sérologique :* négatif, devenant positif seulement entre le 30-e et le 60-e jour (image 3).

— Le malade C.A., de 29 ans, avec données radiologiques et sérologiques antérieures inconnues, a présenté une forme lobulaire compliquée par une pleurésie, mais sans séquelles. *Examen radiologique*: effectué seulement le 10-e jour a été positif, se maintenant pendant 20 jours, et revenant au normal après une année. *Examen sérologique :* RFC positive le 5-e jour (image 4).

— Le malade S.M., de 41 ans, avec image pulmonaire normale et RFC négative avant la maladie, a présenté une forme pneumonique zonale avec évolution sans séquelles. La suspicion de fièvre « Q » établie par *l'examen radiologique* le 7-e jour de maladie, est confirmée le jour suivant par *l'examen sérologique.* Tandis que l'image radiologique rétrocède pour revenir au normal après deux mois, le titre de la RFC augmente en dynamique, diminuant ensuite et se maintenant pendant plus d'une année au titre de 1:8. (image 5).

Image 5

Début clinique	Dynamique de l'image radiologique (RPh)	Tableau radiologique (maximum d'intensité)	Examen sérologique (RFC)	Observations
22. IV. 1957	11.IV.1957: image pulmonaire normale 29.IV.1957: opacité d'intensité pneumonique intéressant la moitié inférieure du champ pulmonaire gauche. Proje tion transversale «in lingula». 3. V.1957: l'image de la base gauche beaucoup plus réduite comme étendue et intensité. 7. V.1957: opacité de faible intensité paracardiaque gauche, de la dimension d'une noix, avec contour diffus. 20. V.1957: transparence pulmonaire normale. Sinus libres. 14.VI.1957: image pulmonaire normale 24.VI.1957: sclérose hilaire et infrahilaire droite.		C.11.IV.1957 = négatif 30.IV.1957 = 1:32 20. V.1957 = 1:256 12.VII.1957 = 1:64 14. XI.1957 = 1:16 10.I.1958 = 1:16 24.VI.1958 = 1:8	Forme zonale pneumonique, avec évo- l tion de 30 jours, sans séquelles

L'analyse comparative des données cliniques, radiologiques et de laboratoire a montré que le pourcentage des images radiologiques a été plus réduit dans les cas à évolution clinique discrète ou asymptomatique que dans les cas

qui ont évolué avec des phénomènes cliniques marqués et qui ont enregistré, en même temps, des titres élevés d'anticorps. Ainsi, au contrôle périodique par RPH et RFC (6), les individus trouvés sérologiquement positifs, qui affirmaient n'avoir présenté aucun trouble subjectif dans la période précédant le contrôle, ont présenté des modifications pulmonaires seulement dans 10% des cas, tandis que chez les personnes ayant présenté, dans la même période, une symptomatologie quelconque, le pourcentage des images pulmonaires positives a été de 41,27%

L'examen sérologique périodique a également montré que le titre maximum, enregistré pour chaque malade, a varié par rapport à la forme clinique de maladie, les cas à évolution asymptomatique présentant un pourcentage plus élevé de titres bas par rapport aux cas qui ont eu une symptomatologie clinique évidente (tableau I).

Tableau I

Incidence procentuelle des titres maxima de la RFC dans les cas à évolution symptomatique et asymptomatique.

Titre de la RFC	Incidence procentuelle du titre maximum	
	cas asymptomatiques	cas symptomatiques
1:8	30,65	28,10
1:16	27,42	1,55
1:32	19,35	12,48
1:64	11,29	17,10
1:128	8,06	17,10
1:256	1,61	9,72
1:512	—	6,20
1:1024	—	6,20
1:2048	1,61	1,55

Il est intéressant de relever qu'indifféremment de l'évolution clinique, le pourcentage le plus élevé d'images pulmonaires normales a été constaté chez les sujets présentant un titre bas d'anticorps (1:8). Ainsi, parmi les cas asymptomatiques, qui ont eu le titre maximum de 1:8, seulement 12,80% ont présenté des modifications radiologiques significatives, 87,20% ayant une image pulmonaire normale. De même, parmi les cas symptomatiques, qui ont eu un titre réduit d'anticorps, seulement 11,12% ont donné des images radiologiques significatives, le reste de 88,88% évoluant avec des images pulmonaires normales.

En ce qui concerne la présence et la persistance des images radiologiques chez les malades observés, elles ont pu être poursuivies pendant 640 jours.

Dans les premiers 30 jours, les images ont présenté différents aspects du point de vue intensité et étendue, étant dans 70,86% des cas significatives pour le diagnostic de la fièvre « Q ». A partir du 30-e jour, on a enregistré les aspects caractéristiques pour les séquelles de cette infection, avec une fréquence qui a diminué progressivement. Par contraste, avec la disparition progressive des

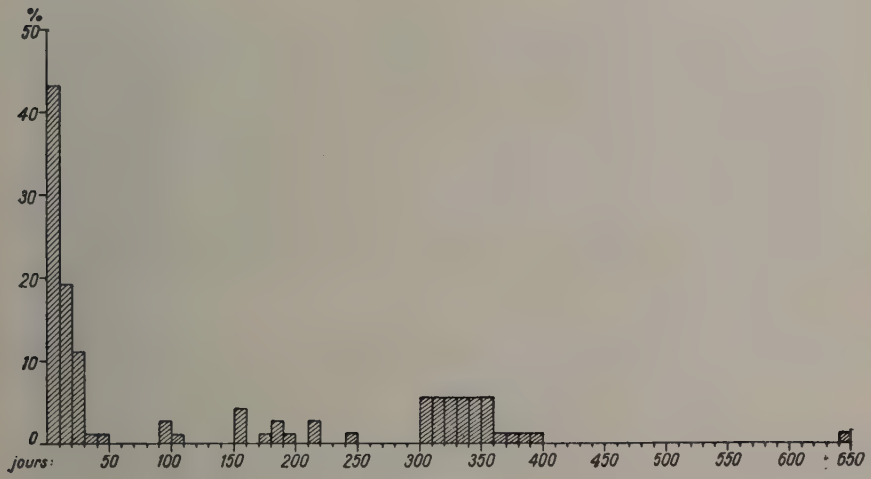
images radiologiques on a observé que les titres des RFC, chez les anciens malades se sont maintenus positifs dans 6,89% des cas, jusqu'à la fin de la période d'observation, respectivement après 640 jours à partir du début de la maladie (Tableau II et graphique 3).

Tableau II

Fréquence procentuelle des images radiologiques et des RFC positives, pendant différentes périodes du début de la maladie.

Jours du début de la maladie	Images radiologiques positives %	RFC positives %
1 — 30	70,86	6,89
31 — 400	27,75	68,90
401 — 640	1,39	17,32
641	0	6,89

Par conséquent, l'examen périodique par RPH des cas fébriles sans étiologie précisée, ainsi que des sujets apparemment indemnes, appartenant à une collectivité agro-zootechnique, permet d'établir précocement la suspicion de fièvre « Q », qui, plus tard, peut être confirmée par les examens sérologiques.



Graphique 3

Pour les cas fébriles, nous recommandons la radiographie par 3 expositions avec des régimes correspondants, mais variés, afin d'enregistrer les moindres nuances, utilisant des films 7 ×7 cm.

CONCLUSIONS

1. La radiophotographie permet un diagnostic précoce à partir du deuxième jour de maladie, qui peut être confirmé ultérieurement par la réaction de fixation du complément (RFC).

2. Les modifications radiologiques ont été présentes: dans 40,31% des cas — entre le 1-er et le 10-e jour, dans 19,44% — entre le 10-e et le 20-e jour, dans 11,11% — entre le 20-e et le 30-e jour et dans 24,16% des cas entre le 30-e jour et la fin de la période d'observation (640 jours).

La RFC n'a été positive dans la première décade qu'en proportion de 13,95%.

3. La fréquence des images radiologiques caractéristiques a été plus réduite dans les cas à évolution clinique discrète ou asymptomatique (10%), que dans les cas à phénomènes cliniques marqués et titres élevés d'anticorps (41,27%).

4. L'examen périodique par la radiophotographie des cas fébriles, sans étiologie précisée, ainsi que des sujets apparemment indemnes d'une collectivité agro-zootechnique, a permis la suspicion précoce de fièvre « Q », qui peut être confirmée ultérieurement aussi par examen sérologique.

5. Chez les malades de fièvre « Q », l'examen radiophotographique doit s'effectuer périodiquement, afin de poursuivre la dynamique de l'évolution des lésions, ainsi que des éventuelles séquelles, l'étude comparative des clichés étant recommandée.

6. Les résultats de la radiophotographie doivent être corroborés aux données cliniques, épidémiologiques et de laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Buşilă V., Alexandresco N., Lustrea V., Tirică R., Vico A,. Petrişor V. et Kecskemeti S. — Comm. S.S.M., Timişoara, 1954.
2. Combiesco D., Ungureanu H., Popesco D. et Gutman N.— St. Cercet. Inframicrobiol. Microbiol, Parazitol., 1952. **5**, 238.
3. Korolev P. A. et Kolotighina A. P. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 7, 14.
4. Kulaghin S. M. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 7, 13.
5. Voicoulesco M., Zamfiresco I., Nicolesco N., Rosca M. et Tofan N. — Travaux Ses. gén. Sc. Acad. R.P.R., 1950. 1321, éd. Acad. R.P.R.
6. Zarnea G., Alexandresco N., Angelesco Gr., Hodoş G., Mladin H. et Voicoulesco R. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960. **19**, 507.
7. Zdrodovski F. P. et Golinevici M. E.— Ucenie o rickettsiah i rickettsioza. Medghiz„ Moscou, 1953, 282.

ЗНАЧЕНИЕ РАДИОФОТОГРАФИИ, ПРИМЕНЯЕМОЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭНДЕМО — ЭПИДЕМИЙ ЛИХОРАДКИ КУ

II. КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЛАБОРАТОРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Р. Ф. дает возможность установить раннюю диагностику, начиная со 2-го дня болезни, причем диагностика подтверждается при помощи Р.С.К.

2. Радиологические изменения присутствовали в 40,31% случаев между 1—10-ым днем с начала заболевания, в 1944 % между 10—20-ым днем и в 11,11% случаев между 20—30-ым днем.

В первой декаде Р.С.К. была положительной только в 13,95% случаев.

3. Характерные радиологические картины встречались реже в случаях с умеренным клиническим течением, или в безсимптомных случаях (10%), чем при заболеваниях, протекавших с более выраженными клиническими явлениями и с более высокими титрами антител (41,27%)

4. Периодическое Р.Ф. обследование лиц, работающих в сельскоживстноводческих хозяйствах, или страдающих лихорадочными заболеваниями, без ясной этиологии, появившихся в тех-же хозяйствах, дает возможность очень рано заподозрить Ку лихорадку, подтверждающуюся в дальнейшем также при помощи серологических исследований.

5. У больных Ку лихорадкой необходимо проводить периодически Р.Ф. исследование для наблюдения за динамикой течения поражений и возможных последствий, причем рекомендуется сравнительное исследование снимков.

6. Результаты Р.Ф. подлежат сопоставлению с клиническими, эпидемиологическими и лабораторными данными.

DER WERT DER RÖNTGENPHOTOGRAPHIE BEIM STUDIUM DES ENDEMOEPIDEMISCHEN Q-FIEBERS

II. BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN KLINISCHEN, EPIDEMIOLOGISCHEN UND LABORATORIUMSERGEBNISSEN.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Röntgenphotographie gestattet eine frühzeitige Diagnose, vom zweiten Krankheitstag an, die später durch die Komplementbindungsreaktion (KBR) bestätigt werden kann.

2. Röntgenologische Veränderungen waren in 40,31% der Fälle, zwischen dem ersten und zehnten Krankheitstag, in 19,44% der Fälle zwischen dem zehnten und zwanzigsten Krankheitstag und in 11,11% der Fälle zwischen dem zwanzigsten und dreissigsten Krankheistag nachweisbar.

Während der ersten 10 Tage war die KBR nur in 13,95% der Fälle positiv.

3. Die Häufigkeit charakteristischer Röntgenbilder war bei Fällen mit verschleiertem oder stummen klinischen Verlauf geringer (10%) als bei jenen, die ausgeprägtere klinische Symptome und erhöhte Antikörpertiter aufwiesen (41,27%).

4. Die periodische röntgenphotographische Untersuchung von Personen in agrozootechnischen Kollektiven und der fieberhaften Fälle mit ungeklärter Ätiologie in den gleichen Kollektiven, ermöglicht die sehr frühe Vermutung einer Q-Fiebererkrankung, die im folgenden auch durch serologische Untersuchungen bestätigt werden kann.

5. Bei Q-Fieberpazienten müssen röntgenphotographische Untersuchungen periodisch durchgeführt werden um die Dynamik der Entwicklung der Schäden und der eventuellen Folgeerscheinungen verfolgen zu können. Die vergleichende Betrachtung der Aufnahmen ist anzuempfehlen.

6. Die Ergebnisse der Röntgenphotographie müssen mit den klinischen, epidemiologischen und Laboratoriumsergebnissen verglichen werden.

THE VALUE OF RADIOGRAPHY AS APPLIED TO THE STUDY OF Q-FEVER ENDEMO-EPIDEMICS

II. CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL, AND LABORATORY CORRELATIONS

SUMMARY

1. Radiophotography affords a means of early diagnosis from the 2nd day of the disease onwards; confirmation may later on be obtained by means of the complement fixation test (CFT).

2. Radiological changes were present in 40.31 per cent of the cases from 1—10 days after the beginning of the disease in 19.44 per cent of the cases between the 10th and 20th day, and in 11.11 per cent of the cases between the 20th and 30th day.

During the first decade the CFT was positive in no more than 30.95 per cent of the cases.

3. The incidence rate of characteristic radiological patterns was lower in cases displaying a light or asymptomatic clinical course (10 per cent) than in those which exhibited marked clinical symptoms and increased antibody titres (41,27 per cent).

4. Periodical radiophotographic examination of the membres of agrozootechnical collectivities and of fever cases with no definite aetiology in the same collectivities allows of the existence of „Q"-fever to be suspected at a very early date. Subsequent confirmation may be obtained by means of serological tests.

5. Periodical radiophotographic examination is required in Q-fever patients in order to follow up their dynamical course of the lesions and possible sequelae. Successive photographs should be examined comparatively.

6. The results of radiophotography should be compared with clinical, epidemiological, and laboratory findings.

OBSERVATIONS SUR LES PORTEURS DE STREPTOCOQUES HÉMOLYTIQUES, DANS DES COLLECTIVITÉS D'ENFANTS, À CARACTÉRISTIQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES VARIÉES

par

I. Ardelean, Coralia Baldovin-Agapi, C. Ieniştea, Ana-Maria Petresco, V. Dumitresco, Ortansa Paşolesco, T. Grigoriu, Al. Pteanco, R. Klein, Florica Negru et Ecaterina Vasiliu

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cocci pathogènes et de l'Institut d'Hygiène de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 19 décembre 1959 —

La classification des streptocoques d'après leur structure antigénique (Lancefield) a permis de nombreuses études, en ce qui concerne les relations épidémiologiques entre l'état de porteur de streptocoques hémolytiques et l'endémo-épidémicité des affections provoquées par ces germes.

Il est actuellement établi que l'état de porteur de streptocoques hémolytiques est un phénomène naturel, signalé surtout dans les pays de la zone tempérée, où prévalent également les affections streptococciques. Le rhino-pharynx de l'homme constitue le réservoir naturel ou accidentel de diverses espèces de streptocoques hémolytiques appartenant aux groupes sérologiques: A, B, C, E, F, O, etc. Des espèces (groupes) mentionnées, sont impliqués dans la pathologie humaine, les nombreux types de streptocoques pyogènes du groupe A; les autres groupes sont rarement rencontrés dans les infections aiguës et jamais dans les infections à caractère épidémique.

Les variations saisonnières de l'état de porteur de streptocoques, la fluctuation des divers types dans la population normale, ainsi que les relations constatées entre la prévalence de certains types et l'incidence des infections streptococciques du type angine-scarlatine, constituent des faits acquis, sur lesquels sont fondées l'épidémiologie et la lutte contre ces infections.

L'état de porteur de streptocoques pyogènes contribue, dans une grande mesure, à l'établissement d'une immunité occulte, se traduisant par la résistance de l'adulte à la scarlatine et autres infections streptococciques.

Si les porteurs de streptocoques groupe A paraissent avoir un rôle réduit dans la transmission directe de l'infection, ils constituent, par contre, un élément de la plus haute importance dans le maintien du réservoir d'infection et le déclenchement des foyers épidémiques.

Les foyers épidémiques de néphrite aiguë, signalés ces derniers temps, ainsi que le rôle des streptocoques hémolytiques dans l'étiopathogénie du rhumatisme situent sur un plan d'actualité les études concernant les porteurs de streptocoques hémolytiques.

Dans le présent travail, nous nous sommes proposés d'étudier l'influence exercée par les facteurs d'ordre social, économique et épidémiologique sur l'état de porteur chez les enfants de diverses collectivités (crèches, foyers, écoles).

Le travail entrepris au cours de l'année scolaire 1951—1952, concernait 3 localités à caractéristiques épidémiologiques différentes, situées à une certaine distance de Bucarest (villes de: Ploești, Urlați, village de Luica).

L'étude a été commencée, une année après une importante épidémie de scarlatine, intéressant le pays entier. Le type épidémique de streptocoque de cette vague de scarlatine a été le type A1, présentant une fréquence moyenne de 64%.

Caractéristiques sociales — économiques et épidémiologiques des localités étudiées.

1. La ville de *Ploești* est un centre industriel important, dont les entreprises comptent de nombreux ouvriers qui se déplacent souvent dans la région. La scarlatine, a présenté une morbidité de 181,80$^{0}/_{0000}$, au cours de l'année 1950, ce qui représente deux tiers du total des cas apparus dans le milieu urbain de cette région. En 1951 (1, I—30, VIII) ont été enregistrés dans cette ville, 139 cas de scarlatine.

2. La ville de *Urlați*, située à 3 Km. d'une route nationale, compte 7 000 habitants, travailleurs dans les entreprises industrielles, agriculteurs et viticulteurs, la population ayant des possibilités de contact avec d'autres centres agglomérés.

La scarlatine se manifeste ici surtout sous forme épidémique, dont les intervalles relèvent des cas sporadiques. Les épidémies de 1943 et 1950, ont marqué, dans cette localité, 20 cas en 1944 et 23 en 1950. Pendant les années interépidémiques, les cas ont varié de zéro à 3. En 1951, on a enregistré 7 cas de scarlatine jusqu'au mois de septembre (début de l'étude).

3. Le village de *Luica*, situé à 60 Km. environ de Bucarest, et à 6 Km. de la route nationale, compte 2 000 habitants, tous agriculteurs. La population est isolée des centres peuplés. Pendant les 10 années précédant cette étude, on a enregistré un seul cas de scarlatine, en 1944.

Groupes étudiés. On a effectué l'examen bactériologique de l'exsudat pharyngien d'environ 30% des enfants des crèches, foyers d'enfants et écoles, de chaque localité.

A Ploești, on a fait des recherches sur 177 sujets (110 enfants, 42 mères et personnel (25 sujets)) de la crèche et du foyer d'une industrie de filature. Les recherches ont compris l'intervalle octobre 1951 — octobre 1952, durant lequel aucun cas de scarlatine n'a été signalé parmi les enfants contrôlés, ni dans leurs familles. Les examens mensuels des mêmes individus ont été continués pendant toute l'année, excepté le mois d'août.

A Urlați, on a contrôlé 251 des 721 écoliers, âgés de 7 à 14 ans. Le lot comprenait 131 garçons (30,60%) et 123 filles (41,80%). On a également contrôlé 17 de 35 enfants d'âge pré-scolaire.

Le lot du village de Luica comptait 129 sujets, dont 83 écoliers, âgés de 7 à 12 ans (25% du total des enfants du village, de cet âge) et 38 enfants d'âge pré-scolaire, provenant du foyer ou de familles à nombreux enfants. Le contrôle mensuel a été effectué durant une année scolaire (septembre 1951 — septembre 1952), les mois de vacances inclus.

MÉTHODE DE TRAVAIL.

Les tampons d'exsudat amygdalien ont été ensemencés sur boîtes Petri à gélose sang (1 tampon par boîte), le jour même du prélèvement. La lecture a été faite après 24 heures d'incubation à 37°C. Les cultures présentant une hémolyse au deuxième passage sur gélose sang, ont été passées sur milieu de conservation et soumises à l'identification sérologique.

L'identification du groupe sérologique a été effectuée à l'aide d'extraits préparés d'après la méthode de FULLER OU LANCEFIELD, avec des sérums groupes A, C et G. Le type sérologique des souches du groupe A a été déterminé par la méthode d'agglutination sur lame avec 29 sérums spécifiques de type, suivant le schéma du Laboratoire de Streptocoques — Références de Colindale.

RÉSULTATS.

Le tableau I montre le nombre de sujets contrôlés et des examens effectués dans chaque localité, ainsi que les souches de streptocoques hémolytiques isolées au cours d'une année.

Tableau I

Nombre des sujets examinés et des récoltes effectuées dans 3 localités, au cours des années 1951—1952

Localité	Sujets examinés	Récoltes	Souches str. hémolytiques (tous les groupes)	Porteurs de str. hémolytiques %
Ploești	177	963	167	17,40
Urlați	295	2 490	486	19,50
Luica	129	1 145	182	15,89
Total	601	4 598	835	

Il ressort de ce tableau, que le taux des porteurs de streptocoques hémolytiques présente, pour l'année entière, des valeurs assez proches, oscillant entre 15,89% à Luica et 19,50% à Urlați.

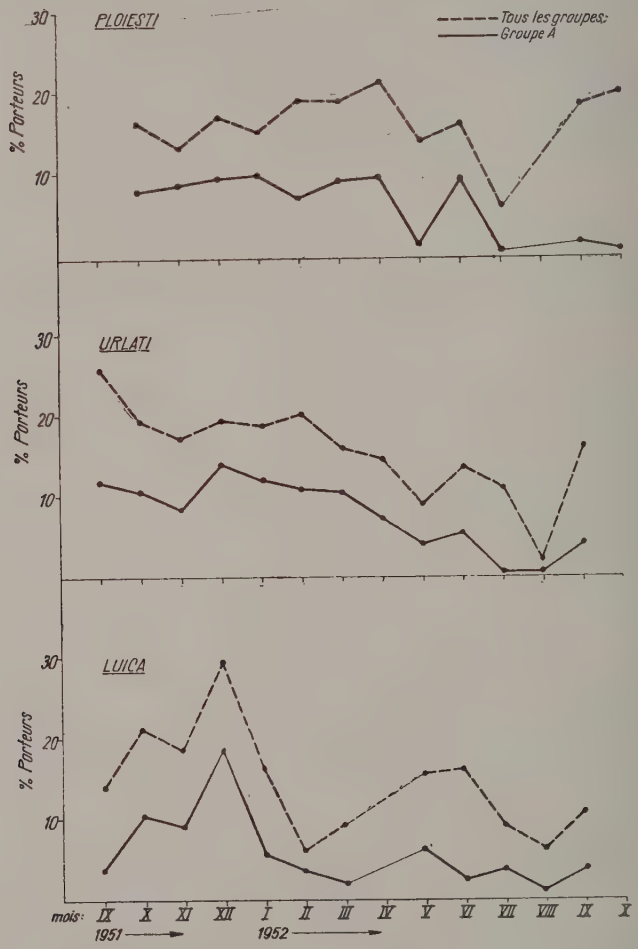
La répartition par groupes sérologiques des souches de streptocoques hémolytiques isolées dans les 3 localités est présentée dans le tableau II.

Tableau II

Répartition par groupe sérologique des souches de streptocoques hémolytiques isolées au cours d'une année, dans 3 localités

Groupe sérologique	Ploești		Urlați		Luica		Total	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
A	59	35,20	232	47,73	79	43,40	370	44,31
C	28	16,80	61	12,55	45	24,72	134	16,04
G	45	26,80	78	16,05	21	11,54	144	17,24
Autres groupes	14	8,65	49	10,09	23	12,64	86	10,30
Non-identifiés	21	12,55	66	13,58	14	7,70	101	12.11
Total	167	100,00	486	100,00	182	100,00	835	100,00

Les streptocoques pyogènes du groupe A ont totalisé 370 (44,31%) des 835 souches isolées. Les streptocoques groupe C étaient présents dans 16,04% des cas et le groupe G, dans 17,24%. Les souches appartenant à d'autres groupes



Graphique 1. Taux mensuels des porteurs de streptocoques hémolytiques (tous les groupes et groupe A) dans trois localités, pendant l'intervalle septembre 1951—octobre 1952.

sérologiques (excepté A, C, ou G) représentent 10,30%, alors que 12,11% n'ont pas été identifiées du point de vue sérologique.

Si l'on considère les divers groupes sérologiques pour chaque localité séparément, on constate une proportion plus élevée du groupe G au détri-

ment du groupe A, à Ploești et un taux plus élevé du groupe C dans la commune de Luica.

La distribution mensuelle des divers groupes sérologiques de streptocoques, dans chaque localité, est représentée dans le graphique ci-dessus. (Graphique 1).

Ce graphique montre l'incidence saisonnière, ainsi que la fluctuation des divers groupes, au cours de l'année. Pendant les mois d'automne-hiver, la fréquence des porteurs de streptocoques hémolytiques (tous les groupes) oscille entre 20% et 30%. On constate une diminution du nombre des porteurs aux mois de printemps (avril-mai), alors que l'été marque des chiffres très bas (2,45% à Urlați et 7,22% à Luica).

Les porteurs de streptocoques hémolytiques du groupe A, représentent environ 50% du total, les valeurs maxima oscillant en hiver, autour de 10%. En été, le pourcentage des porteurs de streptocoques groupe A, montre des chiffres insignifiants et même absence totale dans l'une des localités.

Malgré cet aspect général de la courbe annuelle des porteurs, on constate certaines différences entre les trois localités. Dans les villes, les courbes des porteurs de streptocoques hémolytiques et de streptocoques groupe A ont atteint des valeurs plus élevées, se maintenant en plateau pendant la saison froide. Dans la localité rurale Luica, plus isolée des centres agglomérés, le niveau de la courbe des porteurs de streptocoques groupe A a été très bas, à partir du mois de mars jusqu'en septembre.

Les streptocoques du groupe A. Trois cent six des 370 souches de streptocoques pyogènes groupe A, isolées des 3 localités ont été identifiées du point de vue type sérologique.

Le tableau III, indique la répartition de ces souches, par types sérologiques.

Tableau III

Répartition par type sérologique des souches de streptocoques groupe A, au cours de l'année scolaire 1951—1952, dans 3 localités

Localité	Souches	Types de streptocoques hémolytiques du groupe A														
		1	2	3	4/24/29	5	6	11	12	13	14	23	8/25	27	Imp. 19	Non-identifiées
Ploești	59	—	8	1	5	—	—	—	5	—	3	—	26	—	1	10
Urlați	232	7	33	2	7	21	2	1	19	—	4	1	96	6	1	32
Luica.	79	—	10	—	4	3	—	—	11	3	3	—	19	4	—	22
Total	370	7	51	3	16	24	2	1	35	3	10	1	141	10	2	64
%			16,67		5,23	7,84			11,43				46,00			

Ainsi qu'il ressort du tableau III, environ 14 types du groupe A ont été mis en évidence. L'incidence de ces types a été variable, les uns présentant une fréquence plus élevée, les autres n'étant rencontrés que de manière sporadique. Les types les plus fréquents: 2,4/24/29, 5, 12 et 8/25 représentaient 87,25% des souches groupe A, les types, 1, 3, 6, 11, 13, 14, 23, 27 et Imp. 19 étant plus rarement rencontrés. Le type 8/25 prévalant dans toutes les localités (46,00% des souches, en moyenne) présentait les proportions suivantes: 53,00% à Ploești, 48,00% à Urlați et 33,00% à Luica.

L'incidence élevée du type 8/25, signalé, en même temps à Bucarest (2), nous montre l'aire de diffusion de ce type de streptocoque, au moment de l'étude.

La variété de types, plus grande, à Urlați, pourrait revenir au nombre plus élevé de souches étudiées, ainsi qu'à l'effectif important d'écoliers examinés.

Les types de *Str. pyogenes* les plus fréquemment rencontrés ont marqué, dans chaque localité, des courbes à périodes d'ascension variables. Ainsi, dans le foyer de Ploești, le type 8/25 a prédominé à partir du mois d'octobre jusqu'en mars. A Urlați, le même type de streptocoque, ainsi que le type A2 ont réuni une fréquence maximum dans l'intervalle octobre 1951 — mars 1952, alors que le type A12 a prédominé depuis octobre 1951 jusqu'en février 1952.

Nous mentionnons le fait que le type épidémique A1 et les types endémiques A 4/24/29 et A6 étaient très rares chez les enfants des 3 localités, une année après une épidémie de scarlatine provoquée justement par ces types de streptocoques. Ajoutons que, pendant la période interépidémique étudiée, les streptocoques A 8/25, A12 et A 4/24/29, types actuellement reconnus comme néphritogènes, représentent 62,81% des souches de streptocoques pyogènes, isolées des porteurs sains, au cours d'une année.

Observations sur l'état de porteur de streptocoques hémolytiques, par individu. Le contrôle individuel de l'état de porteur de streptocoques hémolytiques nous a permis de faire une série de constatations concernant la durée de l'état de porteur et les espèces de streptocoques rencontrées.

Au cours de l'étude, le nombre de prélèvements par personne, a varié dans des limites assez larges. Pour les 444 enfants soumis au contrôle, on constate que des 334 élèves de l'école primaire de Urlați et Luica, 78% ont subi 8 à 12 prélèvements par an et 60%, 9 à 12 récoltes, permettant ainsi une observation prolongée de l'état de porteur.

Vu la fréquentation irrégulière des enfants des crèches et foyers, seulement 36% ont subi 8 à 12 prélèvements, et 53,80% entre 5 et 12 examens.

Des 444 enfants, considérés dans les 3 localités, 321 (72,30%) ont été porteurs de *streptocoques hémolytiques* à un ou plusieurs examens. De ces 321 porteurs, 218 hébergeaient des *streptocoques groupe A*, dont: 122 des streptocoques groupe A seul et 96 de *streptocoques groupe A*, auxquels s'ajoutaient des *streptocoques appartenant à d'autres groupes* LANCEFIELD (tableau IV).

Les *streptocoques n'appartenant pas au groupe A*, ont été rencontrés dans 199 cas, dont 103 autres groupes seuls et 96 groupe A, associés à d'autres groupes LANCEFIELD. (Col. 5, 6, 9 et 10 du tableau IV).

En général, des proportions presqu'égales d'enfants étaient porteurs de *streptocoques groupe A*, ou de streptocoques appartenant à d'autres groupes.

Porteurs occasionnels. Considérant l'état de porteur uniquement pour les *streptocoques du groupe A*, on constate que la grande majorité étaient des porteurs occasionnels (134 ou 61,46%) avec un seul examen positif, pour un certain type de streptocoque du groupe A. Les porteurs occasionnels d'autres espèces (groupes C, G) totalisaient 77 individus.

Cent-dix enfants ou 34,58% du total des porteurs de streptocoques hémolytiques, ont présenté des examens positifs répétés (2 à 6 examens), dont 84 avec streptocoques groupe A et 26 avec d'autres groupes.

Tableau IV

Porteurs occasionnels et chroniques de streptocoques appartenant aux divers groupes sérologiques

Localité	Sujets examinés	Str. haem. négatif	Str. haem. positif	Porteurs occasionnels				Porteurs chroniques			
				groupe A	A + autres groupes	Autres groupes	Total	Groupe A	A + autres groupes	Autres groupes	Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Urlați	251	67 26,70	184 73,30	47	30 40,76	36 19,67	113 16,32	36	21	14	71 39,68
Luica	83	26 31,57	57 68,43	4	17 36,84	14 24,56	35 61,40	7	10	5	22 38,60
Ploești	110	30 27,28	80 72,72	19	17 45,00	27 33,75	63 78,75	9	1	7	22 21,25
Total	444	123 27,70	321 72,30	70	64	77	211 65,42	52	32	26	110 34,58

Légende: Les pourcentages des colonnes 2 et 3 ont été calculés par rapport au nombre des sujets examinés
Les pourcentages des colonnes 4,5, 6, 7 et 11 ont été calculés par rapport au nombre total des porteurs de streptocoques hémolytiques.

En résumé, 65,42% des sujets étaient porteurs occasionnels et 34,58% porteurs chroniques.

Porteurs chroniques. En ce qui concerne les 84 porteurs chroniques de *streptocoques groupe A*, on constate que 26 étaient porteurs du même type, 28 présentant un changement de type. Neuf cas ont présenté le même type, à plusieurs reprises, auquel s'est associé un autre type. Dans 21 cas, il n'a pas été possible de préciser s'il s'agissait d'un seul type ou d'un changement de type, toutes les souches n'ayant pas été identifiées.

Il résulte que dans 54 cas, les proportions des porteurs, d'un seul ou de plusieurs types de streptocoques pyogènes, étaient sensiblement égales.

Les porteurs d'un seul type de streptocoques peuvent être séparés en deux catégories: porteurs chroniques, durant plusieurs mois, et porteurs intermittents, chez lesquels le même type a été mis en évidence, à des intervalles de 3, 4, 5 ou même 6 mois. Des exemples des différentes catégories de porteurs sont données dans le tableau V.

Dans 6 cas, dont deux avec streptocoques A 8/25, deux avec A12, un avec A5 et un avec A2, on a trouvé le même type, à deux examens consécutifs, ce qui indique des porteurs d'au moins un mois.

Le cas 95 marque la présence probable du streptocoque type 12 pendant 3 mois. Deux autres cas (303 et 98), où les types A12 et A 8/25 ont été mis en évidence lors de 4 examens successifs, indiquent un état de porteur dépassant 4 mois.

La grande majorité des porteurs chroniques éliminaient le germe à des intervalles de 3 mois (8 cas à type 8/25), ou 4 mois (10 cas à A 8/25, un avec

État de porteur chronique de streptocoque groupe A *Tableau V*

Cas	1951				1952									
	sept.	oct.	nov.	décembre	janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
95	—	+	A 12	A 12	—	0	0	0	0	0	—	—	0	—
303	—	A	A 12	A 12	A 12	A 12	—	0	0	0	—	—	—	—
98	—	0	non ACG	0	0	A 14	A8/25	A8/25	A8/25	A8/25	0	—	—	—
112	—	A8/25	A8/25	0	0	0	0	A8/25	C	—	0	—	—	—
237	—	0	—	0	0	G	A 2	0	0	0	A 2	—	0	0
225	—	0	A 2	0	0	A 1	0	0	0	Al	0	—	+	—
244	—	A 8	0	0	0	A 8	C	0	—	0	—	—	—	0
298	—	A 2	non ACG	G	G	0	—	A 2	0	non ACG	—	—	—	—
25	A 13	—	non ACG	±	0	A 13	0	—	±	G	0	—	0	—
9	A	A 2	0	A 4/24/29	0	0	A8/25	0	0	+	-	—	—	—
45	A 5	G	0	0	A8/25	0	+	—	—	—	—	—	C	—
53	0	A 27	0	0	A8/25	—	G	0	non ACG	0	—	0	0	—
67	—	+	0	0	A8/25	G	A/12	0	G	A 2	G	—	—	—
90	—	G	A 2	A8/25	0	0	C	G	0	0	0	0	0	—
40	non ACG	A8/25	0	A8 25	0	0	A 27	0	—	A 5	-	—	—	—
73	0	0	0	A8/25	0	A8/25	—	A 12	0	—	0	0	0	—
18	0	non ACG	A 2	A 12	A 12	A8/25	A	—	0	0	0	0	0	-
119	A 5	0	A8/25	0	A 12	A8/25	0	0	0	—	—	—	—	
42	non ACG	0	A	0	C	C	0	—	C	0	—	C	A8/25	—
1 M	—	0	0	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0	0
1 C_1	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	0	0
1 C_2	—	0	+++	++	G	—	A 12	++	0	—	—	—	++	G
2 M	—	0	0	0	—	0	—	A	0	0	0	—	0	0
2 G	—	++	++	G	0	G	—	—	+	0	0	—	C	0
3 M	—	0	0	0	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
3 F	—	0	0	non ACG	0	A 2	G	0	C	0	—	—	—	—
4 G	—	0	0	0	0	A 2	G	0	G	0	0	—	—	—
4 F	—	—	—	—	0	0	—	0	0	0	0	—	0	—
5 F	—	0	0	G	0	0	A 14	—	C	0	0	—	0	0
5 F	—	0	0	0	—	—	2	0	non ACG	—	0	—	0	0
29	—	0	G	A8/25	—	G	G	C	+++	—	G	—	—	—

Légende: 0 = absence de streptocoques hémolytiques
+, ++, +++ = examen positif pour le streptocoque hémolytique, souche non-identifiée
A = streptocoque groupe A, type non-identifié:
M = mère:
F = fillette
G = gar on
— = examen non —effectué

A2 et 1 avec A 4/24/29). Dans 3 cas (237, 225 et 244) on a mis en évidence des *streptocoques types* A1, A2 et A8, à 5 mois d'intervalle. Les cas 298 et 25 montrent qu'il est possible d'éliminer de manière intermittente les types A2 et A13, durant 6 mois.

L'état de porteur de plusieurs types de groupe A, avec interférence de streptocoques appartenant à d'autres groupes sérologiques, est illustré par les cas: 9, 45, 53, 67 et 90.

Les observations Nos. 40, 73, 18 et 119 représentent un état de porteur chronique ou intermittent de certains types du groupe A, avec intervention d'autres types ou groupes.

Enfin, le cas 42, indique un état prolongé de porteur de streptocoques groupe C.

En conclusion, des observations faites sur les porteurs chroniques, il ressort qu'environ 11% du total des porteurs de streptocoques hémolytiques ou 16% du total des porteurs du groupe A ont hébergé des *streptocoques pyogènes* pendant une période d'approximativement 6 mois. Les types de *streptocoques groupe A*, impliqués dans les cas prolongés de porteurs ont été: 8/25, 12, 2, 4/24/29, 1 et 13, le type 8/25 étant le plus fréquemment rencontré.

Influence de la famille et du milieu fréquenté par les enfants en bas âge sur l'état de porteur de streptocoques hémolytiques.

Du tableau IV, il ressort que l'état de porteur de streptocoques hémolytiques des enfants d'âge pré-scolaire de Ploești ne diffère pas beaucoup de celui des écoliers des deux autres localités, quant au pourcentage et la durée de l'état de porteur.

Le contrôle concomitant des mères et du personnel de la crèche de Ploești, a fourni des données concernant l'influence exercée sur les enfants, par le milieu fréquenté.

Comparant les espèces de streptocoques trouvées chez le personnel de la crèche et du foyer, on a constaté que les espèces portées par le personnel ont également prédominé chez les enfants qui fréquentaient les institutions respectives. Ainsi, la cuisinière de la crèche (cas 29, tableau V) a hébergé pendant 7 mois, diverses espèces de *streptocoques*, *dont le groupe G* a été mis en évidence quatre fois.

Les *streptocoques du groupe G* représentaient, en même temps, 57,90% du total des souches isolées des enfants de la crèche, pendant une année, ce qui incrimine la cuisinière comme source d'infection.

Les groupes des cas 1 et 2 (tableau V) illustrent l'état de porteur de streptocoques groupe G des enfants de la crèche (1 C2, âgé de 2 ans et 8 mois et 2 G, âgés de 7 mois), coïncidant avec les examens positifs de la cuisinière. Cette espèce de streptocoque n'a pas été mise en évidence chez les mères des deux enfants (1 M et 2 M) et la sœur (1 C1) de l'un d'entre eux.

La même remarque est valable pour le foyer, dont le personnel comptait 4 porteurs de streptocoques A 8/25, l'aide cuisinière éliminant de manière intermittente, des streptocoques du groupe G. Le type A 8/25 a prédominé chez les enfants du foyer. Parmi les cas à nombreux examens positifs, on cite une fillette de 3 ans, avec hypertrophie amygdalienne (cas 67, tableau V) qui, bien que porteuse intermittente de streptocoques groupe G, a porté également les types A 8/25, A12 et A2. La mère, examinée 4 fois pendant cet intervalle, présentait des examens négatifs.

Contrôle des mères et aspects concernant les enfants d'une même famille. Pour vérifier l'influence exercée par le milieu familial sur l'état de porteur de streptocoques hémolytiques, nous avons soumis au contrôle, des mères, ouvrières dans la fabrique, dont les enfants fréquentaient soit la crèche ou le foyer, soit les deux institutions. Les résultats obtenus pour 49 de ces familles, ont été:

a) *Mères et enfants.* Dans 15 familles (30%), la mère et l'enfant n'ont jamais été porteurs. La mère et l'enfant de 11 familles (22%) ont donné des examens positifs, les streptocoques isolés appartenant, pour la plupart, à des groupes différents. Dans 7 familles (14%), la mère a présenté des examens négatifs, les enfants étant parfois porteurs de streptocoques hémolytiques. Enfin, pour 4 familles (8%) l'enfant n'a jamais été porteur, alors que la mère était porteuse de streptocoques hémolytiques. Quant aux mères à 2 enfants, on a observé que la mère et un des enfants étaient négatifs et le second, parfois positif (groupes des cas Nos. 3, 4 et 5 du tableau V).

Dans une autre famille, la mère était porteuse et les enfants négatifs. Enfin, dans une famille, dont les 2 enfants étaient porteurs de streptocoques d'espèces différentes, la mère restait négative.

b) *Enfants de la même famille.* Dans 3 familles à 2 enfants, l'un était porteur, l'autre se maintenant négatif.

DISCUSSION

Les résultats obtenus en ce qui concerne l'état de porteur de streptocoques hémolytiques chez les enfants d'âge pré-scolaire et scolaire, confirment les recherches antérieures, effectuées dans notre pays, sur la fluctuation saisonnière des porteurs, comme phénomène naturel, dans la population normale, aux époques où les infections streptococciques ne revêtent pas un caractère épidémique (1, 5).

Le facteur d'ordre social-économique, se reflète sur l'état de porteur, par le fait que dans les villes à caractère industriel, les courbes de fréquence des divers groupes de streptocoques sont plus élevées pendant la saison d'hiver, alors que dans les villages isolés, le nombre des porteurs baisse à des chiffres minimes, dès le début du printemps.

On remarque également le fait bien connu, que dans une population normale les porteurs de streptocoques groupe A représentent environ 50% du total des porteurs.

Nous soulignons spécialement le fait que les types épidémiques de streptocoques A1, A 4/24/29 et A6 étaient pratiquement absents chez les enfants contrôlés par nous, une année après une importante épidémie de scarlatine, provoquée justement par ces types de streptocoques.

Des recherches beaucoup plus amples sur l'incidence des types de streptocoques hémolytiques, comprenant une période entière inter-épidémique de scarlatine, ont relevé les mêmes faits. (3). La disparition des types épidémiques de streptocoques hémolytiques, après l'épidémie de scarlatine, ne peut avoir, pour le moment, d'autre explication que la modification de la structure antigénique de ces germes (perte de la substance M), par le passage sur un nombre considérable d'individus, au cours de l'épidémie.

En ce qui concerne les types de streptocoques groupe A, rencontrés au cours de cette étude, il faut retenir la prédominance du type A 8/25, ainsi que la présence du type A12. Ces deux types de streptocoques néphritogènes n'ont pas provoqué des néphrites aiguës, dans notre observation.

Le présent travail a permis, en plus, de préciser la durée de l'état de porteur de streptocoques hémolytiques chez les enfants et les relations avec le milieu familial et scolaire.

Le contrôle mensuel (durant une année) a montré que 27,70% des enfants n'ont jamais été porteurs, tandis que 65,41% des porteurs ont présenté un seul examen positif (porteurs occasionnels).

Le reste, (34,61%) des porteurs de streptocoques hémolytiques ont présenté des examens positifs répétés (porteurs chroniques). Onze pour cent du total des porteurs ont gardé le même type, de 2 à 6 mois, avec élimination continue ou intermittente. Saslow et Streitfeld (1951), effectuant des examens hebdomadaires durant 8 mois, ont obtenu sur 53 écoliers, dont 36 avec leurs mères, des résultats similaires aux nôtres. Seulement 6 des enfants étaient porteurs de streptocoques groupe A, appartenant à un ou plusieurs types, chacun marquant un état de porteur prolongé pour un certain type. L'état de porteur de streptocoques A33 s'est prolongé 7 mois pour l'un des enfants. Chez 3 autres, on a isolé pendant 3, 4 et 5 mois, des streptocoques A non-typables, avec éventuelle association d'autres types.

Nos observations sont également en accord avec celles de ces auteurs, en ce qui concerne les possibilités de transmission d'un type de streptocoque de la mère à l'enfant et inversement. Ils notent seulement 5 familles (9,43%), où le même type de streptocoque a été simultanément isolé de l'enfant et de la mère. Nous-mêmes avons très rarement constaté ce fait. Par contre, le personnel de la crèche ou du foyer respectif, porteurs chroniques d'une certaine espèce de streptocoques, semblent avoir joué un rôle positif dans l'infection des enfants.

CONCLUSIONS.

Le contrôle des streptocoques hémolytiques dans l'exsudat amygdalien de 444 enfants d'âge scolaire et pré-scolaire et de 157 adultes (mères, professeurs, personnel), pratiqué mensuellement, pendant une année, a permis de faire les observations suivantes:

1. L'état de porteur de streptocoques hémolytiques présente des oscillations saisonnières, culminant pendant les mois d'hiver. Les streptocoques groupe A ont représenté 44,31% du total des souches de streptocoques hémolytiques, isolées dans l'espace d'une année.

2. Dans les 3 localités contrôlées, on a mis en évidence environ 14 types de streptocoques groupe A, dont A 8/25, A2, A 4/24/29, A12 et A5 ont représenté 81,17% des streptocoques groupe A identifiés. Le type A 8/25 avec une grande aire de distribution, était le plus fréquemment rencontré.

Nous soulignons la présence, au moment de l'étude, des types néphritogènes de streptocoques A 8/25 et A12, en dehors de cas de néphrite aiguë.

3. Des enfants examinés, 72,30% étaient — à un moment donné — porteurs de streptocoques hémolytiques. De ces derniers, 65,40% étaient des porteurs

occasionnels, 34,60% présentant des examens positifs répétés. Environ 50% des porteurs chroniques hébergeaient le germe pendant 2 à 6 mois.

4. La transmission des streptocoques de la mère à l'enfant ou de l'enfant à la mère, paraît assez rare. Les porteurs adultes des institutions fréquentées par les enfants (crèche, foyer) semblent jouer un rôle plus important dans la transmission des streptocoques aux enfants.

BIBLIOGRAPHIE

1. Baldovin-Agapi C., Franche M. et coll. — Ann. Acad. R.P.R., 1950, II, Mém. 32
2. Bruckner I., Baldovin-Agapi C., Dimitriu O. et coll. — Studii şi cercet. Fiziol., Acad R.P.R. 1958, **3**, 287.
3. Ciucă M., Baldovin-Agapi C. et coll. — J. Hyg., Epidem., Microbiol., Immunol. Prague (sous presse)
4. Saslow M.C. et Streitfeld M.M. — J. Inf. Dis., 1959, **104**, 233.
5. Schwentker F.F., Janney J.H. et Gordon J.E. — Am. J. Hyg., 1943, **38**, 207.

ИЗУЧЕНИЕ НОСИТЕЛЕЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВ В ДЕТСКИХ КОЛЛЕКТИВАХ С РАЗЛИЧОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКОЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Исследование гемолитических стрептококков в секрете миндалин у 444 детей из ясель, детских садов и школ, путем ежемесячных взятий в течение школьного года, а также у 157 взрослых (матери, учителя, персонал) привело к следующим наблюдениям:

1. Носительство гемолитических стрептококков в период отсутствия стрептококковых инфекций с эпидемическим характером, проявляет сезонную изменчивость с максимальными цифрами в течении холодных месяцев. Стрептококки А группы составляют — 44,31% из общего количества штаммов гемолитических стрептококков, выделенных в течении года.

2. В трех исследуемых местностях обнаружено до 14 типов стрептококков группы А. Типы A8/25, A2, A4/24/29, A12 и A_5 составляли 81,17% идентифицированных стрептококков группы А. Наряду с широким ареалом распространения, на долю типа A8/25 выпала самая высокая частота — в среднем данный тип встречался в 46%.

Подчеркивается присутствие у детского населения типов A8/25 и A12, обращая внимание на нефритогенные свойства этих типов стрептококков.

3. Из общего количества исследуемых детей, 71,62% давали положительные результаты исследований на гемолитического стрептококка, причем почти половина детей оказались носителями стрептококков группы А. Из общего количества носителей стрептококков группы А, 2/3 оказались случайными носителями, а остальные давали повторно положительные результаты исследования. Приблизительно 1/2 последних явились стойкими носителями, сохраняя микроб от 2 до 6 месяцев.

4. Передача стрептококков от матерей к детям или обратно, встречается доволью редко в то время как взрослый персонал, состоящий из стойких носителей определенных типов стрептококков явно влиял на носительство данных типов среди детей в яслях или в детских садах.

BEOBACHTUNGEN ÜBER TRÄGER VON HÄMOLYTISCHEN STREPTOKOKKEN IN KINDERKOLLEKTIVEN MIT VERSCHIEDENEN EPIDEMIOLOGISCHEN KENNZEICHEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Das tonsilläre Exsudat von 444 Kindern aus Kleinkinderbewahranstalten, Kinderheimen und Volksschulen, sowie von 157 Erwachsenen (Mütter, Lehrer, Personal), wurde monatlich, im Verlauf eines Schuljahres, auf die Anwesenheit von hämolytischen Streptokokken untersucht. Es konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. Während den Zeitspannen, in welchen keine Epidemien von Streptokokkeninfektionen herrschen, weist das Trägertum *hämolytischer Streptokokken* jahreszeitliche Schwankungen auf, mit maximalen Prozentsätzen während der kalten Monate. Die *Streptokokken der Gruppe A* machten 44,31% aller Stämme von *hämolytischen Streptokokken* aus, die im Verlauf eines Jahres isoliert wurden.

2. In den 3 untersuchten Ortschaften wurden bis zu 14 Typen von Streptokokken der A-Gruppe angetroffen. Die Typen A /25, A12, A2, A4/24/29 und A5 machten 81,17% der identifizierten *Strepto o l en der A-Gruppe* aus. Der Typus A25 wies, ausser einem weiten Verbreitungsgebiet, auch die grösste Häufigkeit auf; durchschnittlich, wurde er in 46% der Fälle angetroffen.

Die Anwesenheit der Streptokokkentypen A25 und A12 in der kindlichen Bevölkerung wird hervorgehoben und die Aufmerksamkeit auf die nephritogenen Eigenschaften dieser Typen gelenkt.

3. Von den untersuchten Kindern weisen insgesamt 71,62% positive Ergebnisse der Prüfung auf *h'molytische Streptokokken* auf. Etwa die Hälfte waren Träger von *Streptokokken der A-Gruppe*. Von der Gesamtheit der Träger von *Streptokokken der A-Gruppe*, waren 2/3 gelegentliche Träger, während die übrigen wiederholt positive Ergebnisse aufwiesen. Etwa die Hälfte der letzteren waren Dauerträger, bei welchen der Keim 3 bis 6 Monate lang vorgefunden wurde.

4. Die Übertragung der Streptokokken von den Müttern auf die Kinder, oder umgekehrt, findet ziemlich selten statt, während der Zustand des Dauerträgertums gewisser Streptokokkenarten bei Erwachsenen aus dem Personal der Kleinkinderbewahrsanstalten und Heime, das Trägertum, was die Streptokokkenarten betrifft, unter den Kindern den Anstalten offenbar beeinflusste.

OBSERVATIONS CONCERNING CARRIERS OF HAEMOLYTIC STREPTOCOCCI IN CHILDREN'S COLLECTIVITIES EXHIBITING VARIOUS EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS

SUMMARY

The tonsillar discharge of 444 children from day-nurseries, children's homes, and primary schools, as well as of 157 adults (mothers, teachers, staff), was collected at monthly intervals during a period of one schoolyear and investigated for the presence of *haemolytic streptococci*. The following observations were made.

1. At a time when no epidemic of streptococcal infections is developing, the carrier state as regards *haemo'ytic streptococci* displays seasonal variations, maximal percentage rates being recorded during the cold months. *Streptococci of the A group* amounted to 44.31 per cent of the total number of strains of *haemolytic streptococci* isolated during one year.

2. Up to 14 types of streptococci belonging to group A were detected in the 3 places under investigation. Types A8/25, A12, A2, A4/24/29 and A5 amounted to 81.17 per cent of the identified *streptococci of group A*. Besides a wide area of distribution, type A8/25 also exhibited the highest incidence rate, being present, on an average, in 46 per cent of the cases.

The presence among the infantile population of the *streptococcus types A8/25 and A12* is emphasized and attention is drawn to the ability of these types to cause nephritis.

3. Of the total number of children investigated, 71.62 per cent yielded positive tests for the presence of *haemolytic streptococci*, about half of the carriers harbouring streptococci of group A. Of the total number of carriers *of streptococci of the A group*, two thirds were incidental carriers, while the rest displayed positive tests on repeated occasions. About half of the latter were persistent carriers, the presence of the germ being demonstrable over an interval of 2 to 6 months.

4. The transmission of streptococci from the mothers to their children or vice versa appears to be of rather infrequent occurrence. On the other hand, the existence of persis ent carriers of certain species of streptococci among the adult staff exerted an obvious influence on the carrier state concerning these species among the children in the respective day-nurseries and children's homes.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DU *MÉNINGOCOQUE*

I. PRÉPARATION ET ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE D'UN ANTIGÈNE ISOLÉ DU MÉNINGOCOQUE

par

EUGENIA SORU et AURICA TOPCIU

(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Service de Biochimie Générale et de Cocci Pathogènes)

— Manuscrit reçu le 30 décembre 1959 —

L'obtention d'une composante à caractère antigénique, isolée du méningocoque, a constitué la préoccupation de divers auteurs (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15). Les résultats obtenus n'étant pas concluants, justifient la continuation des recherches dans cette direction.

Le présent mémoire expose le comportement immunologique des complexes à caractère antigénique, isolés du méningocoque types A, B et C, par l'application chez ces germes, d'une technique simple et efficace, antérieurement vérifiée sur d'autres germes (10, 12).

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Souche microbienne : les souches utilisées pour l'extraction du complexe antigénique ont été les souches A (52137), B (52147) et C (52142), obtenues de l'Institut Pasteur de Paris (1957).

Cultures microbiennes : les germes utilisés pour l'extraction du complexe antigénique sont obtenus d'une culture âgée de 18—20 heures, à 37°C, sur milieu gélose peptonée, macérat de viande glucosée 2‰ (pH = 7,6), répartis en boîtes Roux. L'inoculum est constitué par des cultures en gélose-ascite des souches mentionnées ci-dessus.

Préparation des germes : les germes cultivés dans les conditions décrites plus haut sont suspendus en eau saline (ClNa 0,8%) et séparés par centrifugation. Le dépôt microbien lavé à l'eau bidistillée, séparé par une nouvelle centrifugation, est lavé de la même manière, à plusieurs reprises, desséché à l'acétone et éther et maintenu dans l'exsiccateur sous vide. Sous cette forme, les germes peuvent être conservés longtemps, sans entraver la possibilité d'extraction du composant antigénique.

Extraction du complexe antigénique : pour l'extraction de la composante à caractère antigénique, les germes deshydratés de la manière décrite, sont suspendus en eau bidistillée, à raison de 3 g pour 100 ml. La suspension homogénéisée

par agitation avec des perles en verre est maintenue à +4°C pendant 24 heures et ultérieurement chauffée à 80°C (bain-marie) pendant 60 minutes. La durée et la température de chauffage sont critiques, car pour éviter la dénaturation de la composante antigénique, les conditions indiquées doivent être respectées. La suspension microbienne, ainsi traitée, est centrifugée à 10 000 t/m, le surnageant contenant la composante antigénique est soumis à une dialyse, dans des sacs de cellophane pendant 48 heures envers de l'eau courante et 24 heures envers de l'eau bidistillée (+4°C).

Le dialysat débarrassé des particules en suspension par une centrifugation à 10 000 t/m, est stérilisé par passages sur filtre Seitz EK. L'antigène peut être conservé sous cette forme ou bien sous forme d'une poudre obtenue par précipitation à l'éthanol (96°) en proportion de 1:4 (+4°C). Le précipité récolté par centrifugation est desséché dans l'exsiccateur, sous vide. La poudre blanche peut être conservée longtemps sans perte de ses propriétés biologiques spécifiques. Les solutions dans du ClNa (0,8%) de la composante antigénique ont un aspect opalescent, dû au caractère colloïdal de cette composante.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Contrôle de la toxicité des extraits. Le degré de toxicité des extraits a été vérifié sur la souris. Des lots de 10 souris de poids variant de 18—20 g ont été inoculés par voie intrapéritonéale avec des quantités correspondant à 0,5, 1 et 4 mg de substance antigénique, isolée respectivement des types A, B et C. Des souris témoins ont été inoculées par la même voie, avec des suspensions microbiennes appartenant aux germes du même type et contenant 1 mg de germes vivants par ml. Les souris témoins (10 pour chaque type de méningocoque) sont mortes après 24—48 heures, dans une proportion de 50%, tandis que les souris inoculées avec les antigènes isolés de ces mêmes germes ont survécu, indiquant ainsi le manque de toxicité pour la souris de l'extrait antigénique (4 mg).

Contrôle de l'antigénicité: le caractère antigénique des extraits isolés des divers types de méningocoque (A, B, C) a été contrôlé par inoculation intrapéritonéale au lapin du produit administré sous forme d'adsorbat à l'alun de potassium (5%). On a administré par cette voie et sous cette forme un total de 40—48 mg de substance échelonnée, à raison de 4 mg à 7 jours d'intervalle. Les sérums des lapins, ainsi inoculés, acquièrent la propriété de précipiter au contact avec l'extrait microbien utilisé pour l'inoculation des animaux, indiquant ainsi le caractère antigénique de la composante extraite. La précipitation a été vérifiée par la méthode classique de l'anneau, de même que par la méthode de diffusion en gel d'agar.

Les tableaux I, II et III résument les données obtenues dans les expériences de précipitation par la méthode de l'anneau en utilisant les extraits antigéniques isolés des méningocoques types A, B et C et le sérum des lapins ayant reçu ces mêmes extraits par inoculation intrapéritonéale sous forme d'adsorbat à l'alun de potassium. Le tableau I indique le titre précipitant du sérum anti-antigène A envers les antigènes A, B et C. On constate une spécificité de type, le titre précipitant du sérum anti-antigène A envers l'antigène A étant beaucoup plus élevé (1/64 000) que le titre précipitant envers l'antigène B (1/4000) et le titre

précipitant envers l'antigène C (1/2000). Le tableau II indique le titre précipitant du sérum anti-antigène B, le tableau III le titre précipitant du sérum anti-antigène C. On constate pour ces deux types de sérum seulement une spécificité de groupe et non de type. Seul l'antigène A induit donc, chez le lapin, la formation d'anticorps spécifiques de type (tableau I), les antigènes B et C induisant seulement une spécificité de groupe (tableaux II et III).

Tableau I

Titres précipitants des antigènes isolés des méningocoques A, B, et C envers le sérum des lapins inoculés avec l'antigène A (52137).

Dilutions d'antigènes		Sérum anti-méningococcique type A (52137) non dilué								Systèmes témoins		
		1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16.000	1/32.000	1/64.000	1/128.000	Antigènes	Sérum spécifique	Sérum normal de lapin
A (52137)	2 h.	++	++	++	++	+	+±	±	0	0	0	0
	24 h.	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
B (52147)	2 h.	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
(C 52142)	2 h.	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Légende: lecture après 2 heures à 37°C (anneau);
lecture après 24 heures à + 4°C (dépôt);
(±) — (+++) = différentes intensités de l'anneau et du dépôt;
O = absence de précipitation;

Le caractère de spécificité des extraits antigéniques a été contrôlé aussi en rapport avec des sérums monovalents obtenus par inoculation au lapin d'une suspension de germes intacts (type A et respectivement types B et C). Le titre précipitant de ces sérums envers les extraits antigéniques homologues isolés des mêmes souches nous indique une plus stricte spécificité de ces extraits. Ainsi, le titre précipitant du sérum monovalent type A envers l'antigène homologue A est 1/1 024 000, envers l'antigène B et C seulement 1/4 000 (tab. IV); le titre précipitant du sérum type C envers l'antigène homologue C est 1/1 024 000, envers l'antigène A et B 1/64 000 (tab. V); le sérum type B possède un titre précipitant de beaucoup plus faible et indique en même temps une spécificité moins stricte; le titre précipitant envers l'antigène homologue B étant 1/32 000, envers l'antigène C 1/8 000 et envers l'antigène A 1/1 000 (tableau VI).

Les résultats obtenus par l'application de la méthode de diffusion en gel d'agar et, en utilisant les mêmes sérums monovalents de lapin et les mêmes extraits antigéniques, confirment le caractère de spécificité de type pour les antigènes A et C (photos. 1, 2, 4, 5), de même que le caractère moins spécifique de

Tableau II

Titres précipitants des antigènes isolés des méningocoques de types A, B, et C envers le sérum des lapins inocolés evec l'antigène B (52147)

Dilutions d'antigènes		Sérum anti-méningococcique type B (52147) non dilué								Systèmes témoins		
		1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16.000	1/32.000	1/64.000	1/128.000	Antigènes	Sérum spécifique	Sérum normal de lapin
A (52137)	2 h.	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
B (52147)	2 h.	+++	+++	+±	+±	±	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+++	+++	+	+	0	0	0	0	0	0	0
C (52142)	2 h.	++	++	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0

Légende: lecture après 2 heures à 37°C (anneau);
lecture après 24 heures à + 4°C (dépôt);
(±) — (++++) = différentes intensités de l'anneau et du dépôt;
0 = absence de précipitation;

Tableau III

Titres précipitants des antigènes isolés des méningocoques types A, B et C, envers le sérum des lapins inoculés avec l'antigène C (52142)

Dilutions d'antigènes		Sérum anti-méningococcique type C (52142) non dilué								Systèmes témoins		
		1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16.000	1/32.000	1/64.000	1/128.000	Antigènes	Sérum spécifique	Sérum normal de lapin
A (52137)	2 h.	+++	+++	+++	++	±	±	0	0	0	0	0
	24 h.	++	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0
B (52147)	2 h.	+++	++	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+++	+++	+	+	0	0	0	0	0	0	0
C (52142)	2 h.	+++	+++	+++	++	++	+	+	0	0	0	0
	24 h.	++	++	++	++	+	+	+	0	0	0	0

Légende: lecture après 2 heures à 37°C (anneau);
lecture après 24 heures à + 4°C (dépôt);
(±) — (++++) = différentes intensités de l'anneau et du dépôt;
O = absence de précipitation;

Tableau IV

Titres précipitants des antigènes isolés des méningocoques types A, B et C, envers le sérum des lapins inoculés avec des germes vivants type A (52137).

Dilutions d'antigènes	Sérum anti-méningococcique type A (52137) non dilué												Systèmes témoins		
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16.000	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000	1/2.048.000	Antigènes	Sérum spécifique	Sérum normal de lapin
2 h. A (52137)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	+	0	0	0	0
24 h.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	+	0	0	0	0
2 h. B (52147)	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 h.	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 h. C (52142)	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 h.	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Légende : lecture après 2 heures à 37°C (anneau);
lecture après 24 heures à + 4°C (dépôt);
(±) — (++++) = différentes intensités de l'anneau et du dépôt;
O = absence de précipitation.

l'antigène B mis en évidence par la méthode de précipitation en tube (tab. IV, V, VI). Le sérum de lapin normal ne produit aucune ligne de précipitation (Photo. 3).

Les expériences de précipitation effectuées avec des sérums monovalents de cheval et les mêmes extraits antigéniques (types A, B et C) nous indiquent, comme pour les sérums monovalents de lapin, une spécificité de type pour l'antigène isolé des types A et C et une spécificité de groupe pour l'antigène isolé du type B. Le titre précipitant des sérums monovalents atteint des valeurs très élevées pour l'antigène A : 1 /4 915 000 et l'antigène C : 1 /614 400, le titre précipitant pour l'antigène B étant : 1 /75 800.

En comparant le pouvoir précipitant des sérums de cheval, vieux d'un an, on constate l'absence du pouvoir agglutinant, mais la présence du pouvoir précipitant envers les antigènes isolés des germes correspondants. On remarque donc la perte du pouvoir agglutinant, à la suite du vieillissement du sérum, avec la conservation de son pouvoir précipitant. De même, le chauffage pendant une demi-heure à 56°C, trois jours consécutifs, procédé appliqué couramment au titrage des sérums thérapeutiques, diminue le titre agglutinant, sans modifier le titre précipitant.

L'ensemble des résultats obtenus par nous suggère la possibilité d'utiliser les extraits antigéniques isolés des méningocoques par la méthode décrite pour le titrage des sérums thérapeutiques.

Tableau V

Titres précipitants des antigènes isolés de méningocoques types A, B et C, envers le sérum des lapins inoculés avec des germes vivants type C (52142).

Dilutions d'antigènes		Sérum anti-méningococcique type C (52142) non dilué											Systèmes témoins		
		1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16.000	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000	1/2.048.000	Antigènes	Sérum spécifique	Sérum normal de lapin
A (52137)	2 h.	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B (52147)	2 h.	±	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C (52122)	2 h.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+++	+++	+++	++	0	0	0	0
	24 h.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++	0	0	0	0	0	0	0

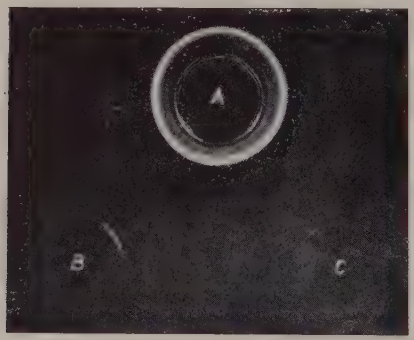
Légende: lecture après 2 heures à 37°C (anneau);
lecture après 24 heures à + 4°C (dépôt);
(±) — (++++) = différentes intensités de l'anneau et du dépôt;
O = absence de précipitation.

Tableau VI

Titres précipitants des antigènes isolés des méningocoques types A, B et C, envers le sérum des lapins inoculés avec des germes vivants type B (52147).

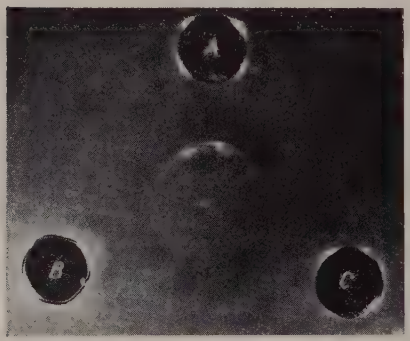
Dilutions d'antigènes		Sérum anti-méningococcique type B (52147) non dilué									Systèmes témoins		
		1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16.000	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	Antigènes	Sérum spécifique	Sérum normal de lapin
A (52137)	2 h.	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B (52147)	2 h.	++++	++++	++++	++	+	±	0	0	0	0	0	0
	24 h.	0	+++	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0
C (52142)	2 h.	++	++	+±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 h.	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Légende: lecture après 2 heures à 37°C (anneau);
lecture après 24 heures à + 4°C (dépôt);
(±) — (++++) = différentes intensités de l'anneau et du dépôt;
0 = absence de précipitation.



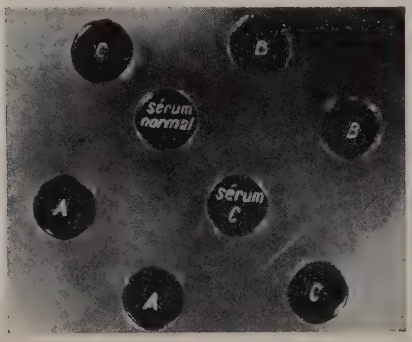
Photographie 1. — Le sérum de lapin immunisé avec le *méningocoque type A* (52137) est englobé dans la gélose; dans les godets sont introduits les antigènes A,B,C.

Photographie 2. — Le sérum de lapin immunisé avec le *méningocoque type C* (52142) est englobé dans la gélose; dans les godets sont introduits les antigènes A,B,C.



Photographie 3. — Le sérum de lapin normal est englobé dans la gélose; dans les godets sont introduits les antigènes A,B,C. (Témoin).

Pho ographie 4. — Le sérum de lapin immunisé avec le *méningocoque type A* (52137), le sérum normal de lapin et les antigènes A,B,C, sont introduits dans les godets, selon la technique d'OUCHTERLONY.



Photographie 5. — Le sérum de lapin immunisé avec le *méni gocoque type C* (52142), le sérum normal de lapin et les antigènes A,B,C sont introduits dans les godets, selon la technique d'OUCHTERLONY

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

On a isolé de différents types de méningocoques (types A, B, C), par une méthode d'extraction aqueuse à chaud (60 minutes à 80°C), une composante atoxique et à caractère antigénique. Cette composante, administrée au lapin par voie intrapéritonéale sous forme d'adsorbat sur support minéral (alun de potassium), induit la formation d'anticorps précipitants à spécificité de type pour l'antigène isolé du type A et à spécificité de groupe pour les antigènes isolés des types B et C.

Le contrôle de la spécificité des mêmes antigènes, effectué par le test de précipitation (méthode „de l'anneau" et méthode de diffusion en gel d'agar) envers des sérums monovalents, obtenus par inoculation au lapin des germes intacts correspondants (méningocoques types A, B et C), met en évidence une nette spécificité de type pour l'antigène A et C, l'antigène B, présentant plutôt une spécificité de groupe.

BIBLIOGRAPHIE

1. Blinchin S.A., Gorodina A.C. Polotchi I.G., et Urazovski S.S. — Jurn. Mikrobiol, epidemiol. i immunologhii 1946, No. 72.
2. Ciucă M., Soru E. et Manolesco-Tudor V. — C.R. Soc. Biol. 1939. **130,** 327
3. Cheve J. — C.R. Acad. des Sc. 1938, **206,** 1204.
4. Chrestownikova V.A. et Riachina E.M. — Jurn. Mikrobiol., epidemiol. i immunologhii 1933, 36.
5. Kabat E.A., Kaiser H. et Sikorski H.: — J. exp. Med. 1945, **80,** 299.
6. Kaare Jyssum: — Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 1958, **42,** 216.
7. Menzel A. E. C. et Rake G.: — J. exp. Med. 1942, **75,** 437.
8. Ouchterlony O.: — Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 1948, **25,** 186.
9. Rake G. et Scherp H.W.: — J. exp. Med. 1933, **58,** 341.
10. Roberts R.S., — J. comp. Path. a Therap. 1952, **59,** 284.
11. Soru E. et Weinberg-Topciu — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie 1945—1947, **14,** 83.
12. Topley W. et Raistrick N.: — Brit. J. exp. Pathol. 1934, **15,** 113.
13. Soru E, Barber Cella, Toma S., Griţaenco V. et Bogokowski B. — C.R. Soc. Biol. 1956, **150,** 2187.
14. Watson G.L., Guido V., Marinetti et H. Sherp: — J. Immunol. 1958, **81,** 337.
15. Watson G.L. et Sherp H.W. — J. Immunol. 1958, **81,** 331.
16. Zozaya J. et Wood J.E.: — J. Inf. Dis. 1932, **50,** 177.

К ИЗУЧЕНИЮ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ МЕНИНГОКОККА

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МЕНИНГОКОККА.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из различных типов менингококка (тип А, В, С) выделили при помощи способа теплой водяной экстракции (60 мин. при 80° С) компонент, лишенный токсичности и обладающий антигенными свойствами. При внутрибрюшном введении кроликам данного компонента адсорбированного на минеральной основе (каллиевые квасцы) вызывается образование преципитирующих антител, обладающих типовой специфичностью для антигена, выделенного из типа А и групповой специфичностью для антигенов, выделенных из типов В и С.

Проверка специфичности тех же антигенов, проведенная при помощи теста преципитации (кольцевой способ и диффузия в геле — агар с моновалентными сыворотками, получе-

нные от кроликов привитых соответствующими цельными микробами (менингококки типа A,B и C) выявляла явную типовую специфичность для антигенов A и C; энтиген B проявляет повидимому групповую специфичность.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER ANTIGENSTRUKTUR DES MENINGOCOCCUS

I. DIE DARSTELLUNG UND IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNG EINES AUS MENINGOKOKKEN ISOLIERTEN ANTIGENS.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus verschiedenen Meningokokkentypen (Typen A, B, C) wurde durch ein Verfahren wässriger Extraktion in der Wärme (60 Minuten bei 80°C) eine atoxische und antigenische Komponente isoliert. Die intraperitoneale Verabreichung an Kaninchen dieser, an eine Mineralunterlage (Kalialaun) adsorbierten Komponente, führt zur Bildung von präzipitierenden Antikörpern, welche mit dem aus dem Typus A isolierten Antigen typenspezifisch und mit den aus den Typen B und C isolierten gruppenspezifisch reagieren.

Eine Kontrolle der Spezifizität dieser Antigene im Präzipitationstest (Ringmethoden und Diffusion in Agargel) gegen univalente, durch Immunisierung von Kaninchen mit den entsprechenden Keimen (Meningokokken der Typen A und C) gewonnene Sera ergab, dass die Antigene A und C eine ausgeprägte Typenspezifizität aufweisen, während das B-Antigen mehr gruppenspezifisch ist.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE ANTIGENIC STRUCTURE OF THE MENINGOCOCCUS

I. THE PREPARATION AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION OF AN ANTIGEN ISOLATED FROM THE MENINGOCOCCUS.

SUMMARY

A non-toxic antigenic compound was isolated through extraction with warm water (60 minutes at 80°C) from various types of meningococci (types A, B, C). When adsorbed on to a mineral support (potassium alum) and administered to rabbits by the intraperitoneal route this compound induces the formation of precipitating antibodies displaying type-specificity for the antigen isolated from type A and group-specificity for the antigens isolated from types B and C.

The specificity of these antigens was checked by means of precipitation tests (ring method and diffusion in agar gel) versus univalent sera obtained by the inoculation of rabbits with intact bacterial cells of the respective types (meningococci of the types, A, B, und C). The antigens A and C were found to display a clear-cut type specificity, while antigen B appears rather to be group-specific.

MÉTHODES D'ÉTUDE DU VACCIN BCG

II-e MÉMOIRE. TESTS EXPÉRIMENTAUX SUR COBAYES (RÉACTION LOCALE, ALLERGIE ET TEST DE PROTECTION)

par

VIRGINIA BOTEZ
MARIA PARASCHIVESCO
Service du BCG — Institut « Dr. I. Cantacuzino »

I. ANGELESCO
I. NAFTA
Laboratoire Central pour le Contrôle d'État des Sérums et Vaccins

C. BONCIU
MONICA PETROVICI
Service d'Anatomie pathologique — Institut « Dr. I. Cantacuzino »

— Manuscrit reçu le 31 mars 1960 —

De toutes les méthodes ayant comme but de définir les caractères du vaccin BCG, la triade expérimentale — les tests de virulence, d'allergie et de protection sur cobayes et souris — considérée comme la plus adéquate pour exprimer les propriétés immunobiologiques de ce produit, retient de plus en plus l'attention des auteurs, qui lui accordent une valeur toujours plus grande.

D'autre part, il est bien connu que l'application de ces 3 tests — dont l'utilisation pour le contrôle routinier du vaccin constitue un desideratum récent (1) — continue à soulever de multiples difficultés techniques et des controverses théoriques.

Les tentatives pour trouver dans un des tests sur l'animal un témoignage du pouvoir allergisant du vaccin chez l'homme, n'ont pas réussi jusqu'à présent à établir une formule unanimement reconnue qui représente un critérium pour l'activité du vaccin. Les corrélations existant entre la lésion locale, l'allergie et l'immunité, leur dépendance nécessaire ou arbitraire, constituent des problèmes toujours actuels qui n'ont pas encore trouvé leur solution définitive.

Notre expérience, acquise au cours du contrôle périodique du vaccin BCG liquide par les tests de virulence, d'allergie et de protection sur cobaye, ainsi que l'opinion déjà exprimée que ces tests expérimentaux (de même que les tests enzymatiques et métaboliques présentés dans un travail antérieur (2)), peuvent faire ressortir des aspects biologiques particulièrement expressifs, pour apprécier la valeur du vaccin BCG, ont imposé leur application systématique dans le but de déterminer la valeur prémunisante du vaccin lyophilisé, en comparaison avec le vaccin frais, la durée de son efficacité, ainsi que la stabilité de cette efficacité dans les limites obtenues. L'étude effectuée sur un grand nombre d'animaux et l'interprétation des résultats à la suite des moyennes obtenues, atténuant en grande mesure les différences dues à la réactivité individuelle des cobayes — facteur au rôle prépondérant dans les tests mentionnés — nous a conduit à une série d'observations et appréciations, qui font l'objet du présent mémoire.

MATÉRIEL ET MÉTODES

L'étude du vaccin BCG par les tests de virulence, d'allergie et de protection a été effectuée sur 850 cobayes, dont 600 vaccinés et tuberculisés et 250 témoins, infectés et non-vaccinés. Ces chiffres représentent les animaux étudiés, au cours de 9 expériences effectuées pendant 1 1/2 année; chaque expérience a compris 70 à 120 cobayes (30—50 vaccinés avec du vaccin lyophilisé, 20—30 avec du vaccin liquide et 20—40 témoins, infectés et non-vaccinés).

On a utilisé 7 lots de vaccin lyophilisé (excipient 10% saccharose et 1% gélatine), stockés pendant 0—18 mois à + 4° ou à la température de la chambre et 7 lots de vaccin liquide de la production courante de notre laboratoire, conservés pendant 1—14 jours en conditions similaires.

Les cobayes de 250—300 g, IDRT-négatifs, ont été inoculés par voie intradermique avec 1 mg vaccin BCG, liquide ou lyophilisé.

Les animaux ont été observés systématiquement en ce qui concerne: la courbe pondérale, le moment de l'apparition, la dimension, l'évolution et la durée de la lésion vaccinale locale.

Basés sur l'opinion de JENSEN (3), suivant laquelle le nodule consécutif à la vaccination intradermique peut servir d'étalon pour le pouvoir pathogène local ou de la « virulence » de la suspension vaccinale, on a considéré l'intensité de la lésion vaccinale comme *test de virulence.*

L'allergie tuberculinique a été contrôlée 30 jours après la vaccination, (48 heures après l'épilation manuelle des cobayes), utilisant 0,1 ml tuberculine brute, diluée 1/10.

L'infection virulente a été faite par voie sous-cutanée, avec 0,01 ou 0,001 mg bacilles tbc — souche H. *ratti* — 50—79 jours après la vaccination. Pour chaque expérience, on a infecté, en conditions similaires, 20 à 40 cobayes témoins, non-vaccinés. La dose infectante a été ainsi calculée pour qu'elle produise la mort d'au moins 50% des animaux témoins, en maximum 3 mois. Etant donné l'influence de la saison et tenant compte de la variation des doses infectantes, la *protection vaccinale* a été évaluée séparément pour chaque expérience, par rapport aux témoins respectifs.

Les animaux ont été tenus sous observation pendant 3 mois, période pendant laquelle on a contrôlé la courbe pondérale, l'évolution de la lésion de surinfection virulente et les modifications des ganglions satellites.

Tous les cobayes qui ont survécu à cette période expérimentale ont été sacrifiés 93—95 jours après l'infection d'épreuve. L'appréciation macroscopique de l'extension et l'intensité de l'infection tuberculeuse a été faite en tenant compte de l'hypertrophie et la caséification des ganglions inguinaux, sous-lombaires, portaux, médiastinaux et cervicaux, des modifications dimensionnelles de la rate et de la fréquence des zones nécrotiques de la rate, du foie et des poumons.

Etant donné que les doses infectantes réduites (1/1000 mg de la souche H. *ratti)* ne déterminent pas toujours, au cours des premiers 3 mois, des lésions macroscopiques caractéristiques chez les cobayes vaccinés, le pouvoir protecteur du vaccin n'a pu être apprécié qu'en rapport des critériums anatomo-pathologiques microscopiques. L'examen histo-pathologique a été effectué sur 486 cobayes: on n'a pris en considération que les animaux qui sont morts ou ont

été sacrifiés après l'apparition des premières lésions microscopiques spécifiques chez les cobayes témoins.

L'indice de tuberculisation a été déterminé pour chaque cobaye, selon la méthode préconisée par l'un de nous (4), avec des modifications occasionnelles. Afin d'établir cet indice numérique on a tenu compte tant de l'aspect macroscopique que de l'aspect microscopique des lésions tuberculeuses spécifiques des ganglions, de la rate, du foie, des poumons, des reins et de la région de l'inoculation. La moyenne des indices individuels de tuberculisation des cobayes appartenant à une même catégorie, représente l'indice collectif de tuberculose organique du groupe respectif d'animaux. En vertu de ces indices on a calculé le pourcentage de réduction de la masse des lésions tuberculeuses chez les animaux vaccinés, par rapport aux témoins, obtenant les *indices moyens de protection*, conférés par le vaccin BCG, liquide ou lyophilisé, après différents intervalles de stockage à + 4° ou à la température de la chambre.

Pour l'interprétation des résultats obtenus, à part les indices moyens de protection, on a pris en considération le degré de résistance acquis par les cobayes, comme suite de la vaccination, résistance qui se traduit par:

— pourcentage des cobayes survivants jusqu'à la fin de l'expérience;

— temps moyen de survie des cobayes, morts dans les 3 mois suivant l'inoculation d'épreuve.

Afin de rendre plus expressif ce dernier facteur, l'augmentation de la résistance a été évaluée par 2 indices:

1. *indice de survie*, qui est directement proportionnel à la moyenne de vie et inversement proportionnel au pourcentage des cobayes morts dans les premiers 3 mois;

2. *indice de résistance*, qui est directement proportionnel à la moyenne de vie et inversement proportionnel à l'indice moyen de tuberculisation des cobayes morts les premiers 3 mois.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des données fournies par les tests de virulence, d'allergie et de protection, effectués sur cobayes, a donné les résultats suivants:

1. La réaction vaccinale locale apparaît 2—3 jours après l'inoculation, sous forme d'un nodule induré, qui atteint son maximum entre 12 et 20 jours; ce nodule persiste 7 à 37 jours pour le vaccin lyophilisé et 7—45 pour le vaccin liquide (tableau I). Il s'exulcère en 12% des cas. La dimension de la lésion vaccinale n'est influencée ni par la durée ni par la température de stockage du vaccin, ce qui prouve que ce test ne peut être utilisé comme indicateur du nombre des germes vivants, qui — comme il est bien connu — varie dans des limites très larges sous l'influence de ces 2 facteurs.

2. Des enregistrements hebdomadaires effectués, il ressort que 95% des cobayes vaccinés présentent une courbe pondérale ascendante, avec une moyenne de 116 g d'augmentation par animal.

3. La sensibilité tuberculinique, examinée 30 jours après la vaccination, a été constatée chez 98,5% des cobayes vaccinés au BCG lyophilisé et chez 97,6% pour ceux qui ont reçu le vaccin frais.

Tableau I

Durée de la réaction locale	Vaccin liquide	Vaccin lyophilisé
moins de 10 jours	2%	5.5%
de 10—15 jours	28%	21 %
de 15—20 jours	20%	25 %
de 20—25 jours	15%	17 %
de 25—30 jours	15%	15,5%
plus de 30 jours	20%	16 %

Dans le tableau II sont montrés les pourcentages de l'allergie vaccinale, exprimés par la moyenne des diamètres maxima des indurations.

Tableau II

Intensité de la réaction allergique	Vaccin liquide	Vaccin lyophilisé
Négative	2,4%	1,5%
± (0 — 5 mm)	7,7%	5,1%
+ (5 —10 mm)	23,9%	20 %
++ (10—15 mm)	21,2%	28 %
+++ (15—20 mm)	25 %	31 %
++++ (dépassant 20 mm)	19,8%	14,4%

Le vaccin lyophilisé, stocké pendant 12 ou 18 mois à +4° ou à la température de la chambre, produit une allergie tuberculinique comparable à celle donnée par le vaccin frais, malgré la différence importante du contenu en germes vivants. Cette constatation prouve que les fluctuations — même très importantes — du nombre des germes vivants, mais toutes comprises dans l'ordre de 10^6—10^7 (comme dans le cas des échantillons de vaccin utilisés par nous), ne déterminent pas de modifications appréciables de l'allergie du point de vue intensité.

4. Après l'inoculation virulente le nodule de surinfection apparaît entre 15 et 30 jours en proportion de 78,1% chez les cobayes vaccinés, et entre 10 et 30 jours en pourcentage de 95% chez les témoins. La constatation que 71,4% des cobayes vaccinés qui n'ont pas présenté de nodules de surinfection ont été indemnes de tbc. et que le reste de 28,6% ont eu un index de tuberculisation entre 1,9— 2,8% est suggestive. Cette observation confirme l'opinion de ZILBER (5) qui considère qu'un haut degré d'immunité peut masquer l'état d'hypersensibilité, empêchant de cette manière la manifestation clinique de la réaction à la surinfection.

Les nodules ont abcédé et se sont ulcérés chez 5,8% des cobayes vaccinés au BCG lyophilisé, chez 5,7% des animaux qui ont reçu le vaccin frais et chez 43,4% des animaux témoins.

On a observé un décalage évident entre les cobayes vaccinés et les témoins quant au moment de l'apparition de l'ulcère; les animaux vaccinés ont présenté

cette lésion dans 66,6% des cas, 10 semaines après l'infection, tandis que pour la même période l'ulcère n'a été constaté que chez 16,6% des témoins. Chez ces derniers la précocité de la dégénérescence en abcès et l'ulcération du nodule de surinfection a été nette; ces manifestations ont été observées dans 50% des cas entre la 3-e et 5-e semaine après l'inoculation virulente.

Il est intéressant de relever que chez les cobayes vaccinés la présence et la persistance de l'ulcère ont toujours été accompagnées d'importantes lésions tbc. macro- et microscopiques.

5. La courbe pondérale a été inexpressive en tant qu'indicatrice de l'évolution du processus d'infection. On a constaté chez de nombreux témoins, qui présentaient une courbe pondérale ascendente et un panicule adipeux considérable, des lésions tuberculeuses massives et généralisées.

6. La mortalité constatée pendant les 3 mois d'observation, a été presque 3 fois plus grande chez les témoins (69,3%) que chez les vaccinés (24,8% chez les animaux vaccinés avec du BCG lyophilisé et 23,7% chez ceux ayant reçu le BCG liquide). On remarque de même, que les cobayes vaccinés ont bénéficié de la moyenne de survie la plus longue (tableau III).

7. L'examen anatomo-pathologique des animaux sacrifiés 3 mois après l'infection virulente, ainsi que des cobayes morts jusqu'à cette date a prouvé qu'approximativement 20% des cobayes vaccinés étaient indemnes de tuberculose; parmi ceux-ci, 82% ont présenté une réaction allergique postvaccinale dépassant 15 mm ∅.

8. Chez environ 57% des cobayes vaccinés, les lésions tuberculeuses étaient limitées exclusivement au niveau du système ganglionnaire — régional ou général — tandis que les témoins ont présenté l'affection circonscrite exclusivement dans les ganglions dans seulement 5% des cas.

9. Les cobayes vaccinés ont présenté des lésions tuberculeuses spléniques dans 43% des cas; cette lésion a atteint une fréquence de 95% chez les témoins. A signaler les importantes modifications de la rate; tandis que chez les vaccinés le diamètre longitudinal moyen a été de 2,64 cm et maximum de 3,66 cm, chez les témoins il a été de 4 cm, respectivement 7,2 cm (tableau III).

10. Une observation intéressante est constituée par l'absence totale des lésions tuberculeuses rénales et la rareté des lésions tbc. hépatiques et pulmonaires chez les cobayes vaccinés, par rapport à la présence et la fréquence de ces lésions chez les témoins (tableau III).

11. Les lésions tbc. présentées par les témoins ont été plus disséminées, plus prononcées et plus avancées que chez les animaux vaccinés. Les réactions fibroblastiques ont prédominé chez les vaccinés, tandis que les lésions nécrotico-hémorragiques n'ont été enregistrées que presque exclusivement chez les témoins.

12. L'examen histo-pathologique, en ce qui concerne l'étendue et l'intensité de l'infection tbc. a relevé d'importantes et évidentes différences entre les animaux vaccinés et témoins: les indices moyens de tuberculisation des cobayes vaccinés ont été environ 3 fois plus petits que ceux des animaux témoins (tableau III).

Considérant l'indice moyen pour les témoins 100, on constate que le vaccin BCG frais et lyophilisé, conservé pendant des périodes différentes à + 4° et + 20° réduit la masse des lésions, avec les pourcentages indiqués dans le tableau IV.

Cobayes	Temp. de conservation du vaccin	Nombre cobayes	Fréquence de l'ulcère	Apparition de l'ulcère		Mortalité au cours de l'expérience	Moyenne de vie des animaux morts (jours)	Cobayes sans lésions tbc.	Cobayes présentant	
				25—50 jours après l'infection	50—93 jours après l'infection				Exclusivement ganglionnaires	Ganglions totalement caséifiés
Vaccinés au BCG liquide	—	180	5.7%	15.8%	84.2%	24.8%	69	21%	59%	15%
Vaccinés au BCG lyophilisé	+4°	220	5.8%			25.1%	70	22.4%	56%	4%
	+20°	200				22.3%	75	19.7%	57%	
Témoins	—	250	43.4%	50%	50%	69.3%	63	0%	5%	63%

Tableau IV

Vaccin	Durée de conservation	température de conservation	indices moyens de protection
Vaccin lyophilisé	6 mois	+ 4°C	74%
		+20°C	65%
	12 mois	+ 4°C	53.5%
		+20°C	46.5%
	18 mois	+ 4°C	55%
		+20°C	52%
Vaccin liquide	1—3 jours	+ 4°C	83%
		+20°C	79%
	8—11 jours	+ 4°C	77%
		+20°C	59%
	11—14 jours	+ 4°C	71%
		+20°C	52%

En corroborant les indices moyens de protection avec ceux de *survie* et de *résistance* (les derniers étant environ 3 fois plus grands chez les vaccinés que chez les témoins (tableau III)) on peut conclure:

a) Le vaccin BCG frais réduit la masse des lésions tbc d'un pourcentage variant entre 83% et 52% en fonction de la durée et la température de stockage. Ces chiffres démontrent la diminution, avec le temps, du nombre des unités vivantes du vaccin, exprimant la corrélation qui existe entre le nombre de ces unités et la résistance spécifique induite. En même temps, ils indiquent que le test

Tableau III

des lésions tuberculeuses				Diamètres de la rate (cm)		Indices de tuberculisation		Indices moyens de protection	Indices moyens de vie	Indices moyens de résistance
lésions spléniques	lésions hépatiques	lésions pulmonaires	lésions rénales	moyens	extrêmes	moyens	extrêmes			
41%	20.5%	5.5%	0%	2.48	1.8—3.57	3.55	1—8.7	61%	2.8	18,4
44%	11%	5%	0%	2.49	1.5—3.75	3.52	1.16—9	61%	2.8	18.5
43%	10%	5.3%	0%	2.79	2—3.66	3.67	1.2—8.4	60%	3.3	18.9
95%	87%	65%	10%	4.07	2.2—7.2	9.7	2.7—16.8	—	0.9	6.4

de protection sur cobayes réussit à mettre en évidence et à signaler les différences du contenu en germes vivants (réduction d'environ 90%) par rapport aux tests de virulence et d'allergie qui, de ce point de vue, sont totalement inexpressifs. A l'appui de notre affirmation vient s'ajouter aussi la similitude des indices de protection conférés par le vaccin lyophilisé, conservé pendant 12 ou 18 mois à +4°, c'est-à-dire par un vaccin qui, grâce à la stabilité biologique acquise par cryodeshydration, présente des fluctuations minimales du nombre des germes vivants. Cette remarquable sensibilité du test de protection, lui assure une indiscutable supériorité vis-à-vis de toutes les autres épreuves expérimentales sur cobayes.

b) Les indices moyens de protection ont prouvé également que le vaccin BCG lyophilisé, stocké pendant 6 mois à +4° ou +20°, possède une valeur prémunisante, au moins égale à celle du vaccin liquide, conservé dans les mêmes conditions de température, pendant 8 à 11 jours. Le vaccin lyophilisé, conservé pendant 12 ou 18 mois à +4° possède la même valeur immunisante que celle du vaccin frais conservé 11—14 jours à +20°.

13. A mentionner le fait — particulièrement important — que l'examen microscopique a permis de déceler des lésions tbc. malgré l'aspect anatomopathologique macroscopique normal, dans un pourcentage de: 1,25% dans les ganglions, 3,7% dans la rate, 5% dans le foie et 20% dans les poumons. Ces chiffres prouvent d'un côté la nécessité de cet examen dans le test de protection sur cobayes, et montrent d'un autre côté que les critériums anatomopathologiques microscopiques augmentent la rigueur, la sensibilité et l'exactitude de ce test, saisissant des nuances qui ne s'observent pas à l'examen macroscopique.

De plus, vu que chez les cobayes l'efficacité du vaccin BCG ne se traduit pas par une protection totale, mais seulement par une augmentation de la résistance spécifique envers l'infection virulente, nous considérons que l'examen histo-pathologique des lésions — synthétisé par un indice exprimé en chiffres

— offre une possibilité adéquate et scientifique pour exprimer quantitativement, le degré de protection conféré expérimentalement par des vaccins de provenance différente ou de différents lots du même vaccin.

Ce test nous a permis de constater que des lots de vaccin préparés à 3—4 mois d'intervalle, assurent aux cobayes vaccinés et tuberculisés, le même degré de protection. Cette constatation nous offre l'occasion de conclure que le test de protection sur cobayes, allant jusqu'à l'analyse histo-pathologique microscopique, met, non seulement en évidence le degré du pouvoir prémunisant du vaccin, mais — de ce point de vue — peut nous informer également sur l'homogénéité des lots successifs de production dans les laboratoires du BCG.

14. Outre les informations précieuses sur les possibilités des tests sur cobayes de refléter des aspects biologiques essentiels du vaccin BCG, de leur expérimentation sur un nombre considérable d'animaux, certaines conclusions en résultent, se rapportant aux problèmes théoriques et pratiques, largement débattus dans la littérature.

Ainsi que la majorité des auteurs, nous n'avons pas réussi à établir une corrélation entre la dimension de la lésion locale et l'intensité de l'allergie post-vaccinale. Par contre, l'observation systématique sur 600 cobayes vaccinés, a permis une autre constatation, très nette, que nous n'avons trouvée mentionnée nulle part: le degré de l'allergie tuberculinique varie dans le même sens que la durée moyenne de la réaction locale (tableau V).

Tableau V

Dimensions des réactions tuberculiniques	Durée moyenne de la réaction locale
+ (5—10 mm)	11.6 jours (7—19)
++ (10—15 mm)	15 jours (9—20)
+++ (15—20 mm)	16.9 jours (11—26)
++++ (dépassant 20 mm)	23 jours (16—47)

En même temps, l'analyse des indices moyens de tuberculisation des animaux vaccinés, rapportés à la durée de la lésion locale, prouve que la résistance spécifique la plus marquée — de même que l'allergie — a été rencontrée chez les cobayes chez qui la réaction post-vaccinale a duré plus de 35 jours (tableau VI).

Tableau VI

Durée de la réaction locale	Indices moyens de tuberculisation.
de 7—10 jours	5.9
de 11—15 jours	4.4
de 16—20 jours	4.3
de 21—35 jours	2.74
dépassant 35 jours	0

Il paraît donc, que la présence prolongée de la lésion vaccinale, assurant un *dépôt* intradermique, d'où l'antigène peut être résorbé peu à peu, d'une manière régulière et totale, détermine la réponse allergique et immunitaire la meilleure.

15. Une corrélation suggestive se dégage de la confrontation du degré de résistance à l'infection virulente — exprimée par l'indice de tuberculisation — et de l'intensité de l'allergie post-vaccinale, se traduisant par les dimensions moyennes des réactions tuberculiniques. Analysés en ensemble, nos résultats ont relevé malgré les grandes différences individuelles — un parallélisme évident entre le potentiel allergénique et immunogène du vaccin BCG (tableau VII).

Tableau VII

Allergie post-vaccinale (dimensions moyennes)	Indices moyens de tuberculisation	
	Vaccin liquide	Vaccin lyophilisé
Négative	8.2	8
± (2—5 mm)	5.3	7.7
+ (5—10 mm)	4.9	5
++ (10—15 mm)	4.4	4.6
+++ (15—20 mm)	4.2	4.3
++++ (dépassant 20 mm)	3.9	3.5

Il est intéressant de signaler que, tandis que l'absence totale des lésions tuberculeuses a été enregistrée exclusivement chez les cobayes avec une allergie nette post-vaccinale, la présence de cette même allergie — même très intense — s'est observée parfois aussi en absence totale de la résistance spécifique. Bien que cette constatation rappelle que l'allergie n'est pas l'unique mécanisme impliqué dans l'immunité, nous considérons que le matériel expérimental présenté, permet d'accepter pour le contrôle de routine l'idée que le vaccin qui détermine un degré collectif élevé d'allergie, aura en même temps un effet immunitaire satisfaisant.

16. Étant donné que chez les cobayes vaccinés, qui ont présenté une ulcération précoce et persistante au niveau de l'inoculation virulente, on a observé également les indices de tuberculisation les plus élevés — variant entre 4,3—11,7, avec une moyenne de 7,7, nous considérons que l'observation de l'apparition et de l'évolution de cette lésion, permet de mettre clairement en évidence le degré de protection des animaux avant de les sacrifier. Ce test, ainsi que celui de FRAPPIER et coll. (6) basé sur la réduction de la fréquence ou le retard de l'apparition du nodule de surinfection, pourrait constituer un indicateur quantitatif supplémentaire de la résistance collective induite par un vaccin BCG.

CONCLUSIONS

1. Les résultats des tests de virulence, d'allergie et de protection sur cobayes permettent de conclure que chacun d'entre eux reflète un autre aspect de l'activité du vaccin BCG, activité qui, étant un « système plurifactoriel », selon l'expression de DUBOS, ne peut se définir par un test unique.

2. Pour le contrôle courant du vaccin, une importance spéciale doit s'attribuer à la *durée* de la lésion locale et au *degré* de l'allergie postvaccinale, manifestations réactionnelles de l'organisme vacciné, qui paraissent être directement proportionnelles au degré de la résistance spécifique.

3. Le test de protection sur cobayes, allant jusqu'à l'examen anatomopathologique microscopique, constitue — par la valabilité des données fournies — l'épreuve la plus expressive de l'activité du vaccin BCG.

4. La fréquence, la précocité et la persistance de l'ulcère au niveau de la réinoculation virulente, étant en rapport quantitatif avec le degré moyen des lésions organiques tbc, peuvent constituer un indicateur précieux de la résistance collective acquise par les animaux à la suite de la vaccination.

5. L'application des tests expérimentaux sur cobayes pour l'étude comparative du vaccin BCG frais et lyophilisé, a démontré que l'activité protectrice des deux produits présente une évidente identité.

BIBLIOGRAPHIE

1. Levy F. M. — Symposium Int. BCG, Varsovie, juin 1959.
2. Botez V., Paraschivesco M., Soru E., Sculptoreanu I. et Istrati M. — Arch Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 553.
3. Jensen K. A. et Kiaer I. — Bull. Union Int. contre la Tuberculose, 1957, **27**, 167.
4. Bonciu C., Eustatziou G., Ioan C. L., Berceanu S. et Zuzovski G. — Contrib. à l'étude de la chimiothérapie tbc. Acad. R.P.R., 1949, **1**, 150.
5. Zilber L. A. — Bases de l'immunologie (tr. du russe) 3-e éd. Moscou, 1958, 293.
6. Frappier A., Martineanu B. et Dobija M. — Ann. Inst. Pasteur, 1954, **87**, 131.

СПОСОБЫ ИЗУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ Б.Ц.Ж.

ДОКЛАД II-ОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ НА МОРСКИХ СВИНКАХ (МЕСТНАЯ РЕАКЦИЯ, АЛЛЕРГИЯ И ТЕСТ ЗАЩИТЫ)

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Результаты испытаний на морских свинках вирулентности, аллергии и защиты разрешают нам придти к выводу, что каждый из данных тестов, также как и энзиматические и метаболические тесты, представленные в прежней работе (6) — , отражают другую сторону действия вакцины Б. Ц. Ж., являющеися по словам Дюбо(7) «многофакторной системой», не поддающейся определению путем единственного теста.

2. Для очередного контроля вакцины необходимо учитывать «продолжительность» местного поражения и степень послевакцинальной аллергии, являющиеся проявлением реакций вакцинированного организма, и находящиеся повидимому в прямой зависимости от степени специфической устойчивости.

3. Тест защиты на морских свинках, включающий микроскопическое анатомо-патологическое исследование, является, имея в виду достоверность доставленных им данных, — наиболее выразительным испытанием действия вакцины Б. Ц. Ж.

4. Частота, ранее появление и стойкость язвы на месте введения вирулентного материала зависят количественно от средней степени органических туберкулезных поражений и в виду этого способны служить в качестве ценного показателя коллективной устойчивости, приобретенной животными вследствие вакцинации.

5. Применение экспериментальных тестов на морских свинках для экспериментального изучения живой и высушенной вакцины Б. Ц. Ж., доказало, что защитные свойства обеих препаратов идентичны.

METHODEN ZUM STUDIUM DES B.C.G.-IMPFSTOFFES

II. ABHANDLUNG: EXPERIMENTELLE TESTE AN MEERSCHWEINCHEN (LOKALE REAKTION, ALLERGIE UND SCHUTZTEST)

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Ergebnisse von Virulenz-, Allergie und Schutztesten am Meerschweinchen gestatten den Schluss, dass jede dieser Prüfungsarten — ebenso wie die enzymatischen und metabolischen Teste, die in einer vorausgehenden Arbeit beschrieben wurden (6) — eine andere Seite der Wirksamkeit des B.G.C.-Impfstoffes wiederspiegelt. Diese Wirksamkeit ist, nach dem Ausdruck von Dubos (7), ein „Système plurifactoriel" und kann nicht durch einen einzelnen Test erfasst werden.

2. Bei der laufenden Kontrolle des Impfstoffes muss der „Dauer" des örtlichen Schadens und dem Grad der durch die Impfung hervorgerufenen Allergie besondere Bedeutung beigemessen werden. Diese beiden Reaktionsformen des geimpften Organismus scheinen dem Ausmass der spezifischen Resistenz direkt proportional zu sein.

3. Der Schutztest am Meerschweinchen, mit anschliessender histopathologischer Untersuchung stellt, durch die Gültigkeit der Ergebnisse, die getreueste Probe der Wirksamkeit des B.C.G.-Impfstoffes dar.

4. Die Häufigkeit, Frühzeitigkeit und Dauer der Geschwüre am Ort der virulenten Wiederimpfung stehen zu der durchschnittlichen Ausdehnung der organischen tuberkulösen Schäden in einem quantitativen Verhältnis. Sie können daher als ein wertvolles Anzeichen der durch Impfung erworbenen kollektiven Resistenz der Tiere dienen.

5. Durch Verwendung der experimentellen Teste am Meerschweinchen bei einer vergleichenden Untersuchung des flüssigen und des lyophilisierten B.C.G.-Impfstoffes konnte gezeigt werden, dass diese beiden Produkte offenbar die gleiche Schutzwirkung aufweisen.

METHODS OF STUDYING BCG VACCINE

SECOND REPORT. EXPERIMENTAL TESTS IN THE GUINEA-PIG (LOCAL REACTION, ALLERGY, AND PROTECTION TEST)

SUMMARY

1. The results of virulence, allergy, and protection tests in guinea-pigs lead to the conclusion that each of these tests — just like the enzymatic and metabolic test described in a previous paper (6) — renders another aspect of the activity of BCG vaccine. This activity being, according to an expression of Dubos (7), a "système plurifactoriel", it cannot be defined by any single test.

2. For the current testing of the vaccine "the duration" of the local lesion and the degree of post-vaccinal allergy should be granted particular importance, these reactions of the vaccinated body appearing to be directly proportional to the degree of specific resistance.

3. Due to the validity of the data it supplies, the protection test in guinea-pigs followed by microscopic examination affords the most expressive test of the activity of BCG vaccine.

4. The incidence rate, precociousness and persistance of local ulcers following virulent re-inoculation appear to stand in a quantitative relationship to the average extent of organic tuberculous lesions and may afford a valuable index of the collective resistance acquired by the animals following vaccination.

5. Experimental tests in guinea-pigs were used for a comparative study of fresh and lyophilized BCG vaccine. Both products were found to possess the same protecting effectivness.

RECHERCHES SUR LES PÉNICILLINASES BACTÉRIENNES

NOTE II. TITRAGE DE LA PÉNICILLINASE PAR UNE MÉTHODE DIFFUSIMÉTRIQUE DIRECTE

par

A. Săsărman et Thea Horodniceanu

avec la collaboration technique de Rodica Ciulley

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 12 juin 1960 —

Parmi les diverses préparations bactériennes, celles qui permettent une détermination facile et précise de leur activité sont certainement celles de nature enzymatique. Les méthodes de titrage des enzymes sont actuellement basées sur des connaissances scientifiques beaucoup plus exactes que celles de titrages d'autres produits bactériens (ex: les toxines, excepté celles dont la nature enzymatique a été démontrée).

Ce fait permet, en même temps, une définition plus précise des unités d'activité des produits bactériens de nature enzymatique, satisfaisant, entre autres, les exigences de la pratique, les préparations respectives devant être utilisées dans des quantités appropriées au but poursuivi. Ainsi s'explique le fait que malgré l'existence de nombreux produits bactériens de nature enzymatique, les essais en vue de définir les unités d'activité n'ont été effectués que pour les produits plus largement répandus dans la pratique bactériologique.

La pénicillinase sécrétée par de nombreuses bactéries et champignons, dont la présence constitue un véritable péril pour la production de la pénicilline, est un des produits bactériens eznymatiques très répandus dans la pratique. Les avantages pratiques de la pénicillinase se sont montrés peu après sa découverte, soit dans les épreuves de stérilité de la pénicilline, soit dans les hémocultures. Dans le domaine de la génétique, la pénicillinase est employée, dans les diverses techniques utilisant la pénicilline.

Parallélement à l'application pratique, on a fait des études théoriques sur l'enzyme, augmentant sensiblement les connaissances sur la pénicillinase.

Quant aux méthodes de titrage de la pénicillinase, chapitre qui renferme le but poursuivi dans ce travail, il faut mentionner que, contrairement aux affirmations (faites au début de cette note) il n'existe pas une méthode unanimement acceptée pour le titrage de ce produit enzymatique, pas plus qu'une définition de l'unité d'activité standard. Ce paradoxe ne peut être expliqué que par le fait que le produit n'étant pas injectable, la standardisation de la pénicillinase s'impose dans une moindre mesure que celle de certains vaccins.

Les méthodes actuelles de titrage de la pénicillinase sont fondées en principe sur la détermination de la quantité de pénicilline détruite par une certaine prépa-

Méthodes proposées pour

Méthode	Auteurs	Méthode 1-ère étape
Méthodes biologiques	Le Page, G. A., Morgan J. F., Campbell M. E. J. Biol. Chem., 1946, 166, 465	2 ml dil. de pénicillinase en tampon phosphate pH=7,0+0,2 ml pénicilline (10 U.I./ml)
	Housewright R. D., Henry A. J. J. Biol. Chem., 1947 167, 553	Dil. de pénicillinase en bouillon + 10 U.I. pénicilline + culture test
	McQuarrie E. B., Liebmann, A. J. Arch. Biochemistry, 1944, 5, 307	Pénicillinase quant. var. (0—5 ml) Tampon phosphate 1%, pH 7,0 ad 10 ml + 1 ml pénicilline (50 U.I./ml)
	Lawrence C. A. J. Bact., 1945, 49, 57	1 ml pénicillinase + 1 ml pénicilline (40—48 U.I./ml)
	Benedict R. G., Schmidt W. H., Coghill R. D. Arch. Biochem., 1945, 8, 377	Pénicillinase + 1 ml pénicilline (100 U.I.) en tampon phosphate, pH 7,0
	Himes A. T., White H. J. J. Bact., 1944, 47, 426	Pénicillinase + 100 U.I. pénicilline
	Markov W., Bardarov S., Popov E. Mitt. Mikrob. Inst. Bulg. Akad. Wissenschaften, Sofia, 1954, 5	1 ml dil. pénicillinase en tampon phosphate pH 7,0 + 1 ml pénicilline (100 U.I.)
	Iland C. N., Baines S. J. Path. a. Bact., 1949, 61, 329	Pénicillinase + quantités variables de pénicilline
Méthodes chimiques	Henry R. J., Housewright R. D. J. Biol. Chem., 1947, 167, 559	Méthode manométrique. Dosage en présence de $NaHCo_3$. Pénicilline: 5000 U.I. pH 7,0 Appareil Warburg
	Pollock M. R., Torriani A. M. C.R. Ac. Sci., Paris, 1953, 237, 276	Méthode manométrique. Dosage en présence de $NaHCo_3$. Conc. pénicilline > 1000 U I./ml (pénicillinase saturée par substratum) pH = 7.0. Appareil Warburg
	Perret C. J. Nature (Lond.) 1954, 174, 1012	Méthode iodométrique

+) La méthode présente une seule étape.

Tableau I

le titrage de la pénicillinase

proposée			
Incubation	2-e étape	Unité proposée	Quantité de pénicilline détruite par 1 U.I.
1 h. à 37°C	Titrage de la pénicilline par la méthode diffusimétrique en surface (technique des cylindres)	Dilution détruisant 50% de la pénicilline	1 U.I.
48 h. à 37°C	*)	La plus grande dilution permettant la croissance	Approx. 10 U. I.
1 h. à 37°C	Titrage de la pénicilline par la méthode diffusimétrique en surface (technique des cylindres).	Quantité détruisant 57,5% de la pénicilline	Approx. 29 U. I.
24 h. à 40°C	Ibid.	—	—
3 h. à 30°C	Ibid.	Quantité détruisant 50% de la pénicilline	50 U.I.
	Titrage de la pénicilline	—	—
1 h. à 37°C	Titrage de la pénicilline par la méthode diffusimétrique en surface (rondelles de papier filtre).	La plus grande dilution qui détruit l'entière quantité de pénicilline	Approx. 100 U.I.
½—1 h. à 37°C	Ibid.	—	—
36°C		—	—
30°		Quant. hydrolysant 1 micromol benzilpénicilline/h.	Approx. 593 U.I.

ration enzymatique, soit par la mise en évidence et dosage de la pénicilline restante ou de ses produits de dégradation, soit par la mise en évidence de l'absence de la pénicilline.

Le tableau I indique plusieurs méthodes de titrage et les unités proposées pour la définition de l'activité de la pénicillinase par divers auteurs. On remarque que la plupart des méthodes sont biologiques et seulement quelques unes chimiques.

Guidés par des considérations théoriques, la majorité des méthodes, à quelques exceptions près (méthode Iland et Baines, Tableau I), utilisent des quantités constantes de substratum et des quantités variables d'enzyme.

Les méthodes chimiques paraissent être plus précises, mais elles présentent le désavantage d'exiger de grandes quantités de substratum et ne peuvent mettre en évidence des quantités réduites de pénicillinase.

En ce qui concerne la définition de l'unité d'activité, on a proposé au moins 5 unités différentes déterminées par une méthode biologique, et une unité déterminée par une méthode chimique (tableau I). Ces unités représentent la plus petite quantité d'enzyme capable de détruire 1, 10, 29, 50 ou 593 U. I. pénicilline, ce qui ne permet pas de tirer des conclusions sur la valeur comparative des résultats obtenus par divers auteurs.

La plupart des méthodes biologiques comprennent deux étapes: incubation de l'enzyme avec la pénicilline (dans une première étape) suivie, après un intervalle variable (selon la méthode), de la détermination du contenu en pénicilline.

Afin de simplifier la méthode, nous avons essayé de réunir les deux étapes en incorporant la pénicilline dans la gélose et en répartisant la pénicillinase seule dans les cylindres en verre. Nous avons réalisé ainsi une méthode simple, dont la précision correspond à celle des autres méthodes de diffusimétrie et que nous avons désignée: *méthode diffusimétrique directe*, vu que dans ce cas c'est l'enzyme et non la pénicilline qui diffuse. Ce principe a déjà été appliqué par LAHELLE (6) pour la mise en évidence de la capacité des colonies isolées de Proteus, de produire la pénicillinase sans obtenir d'ailleurs des résultats satisfaisants.

Le présent travail synthétise les résultats obtenus par cette nouvelle méthode de titrage de la pénicillinase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

En vue de la mise au point du titrage de la pénicillinase par la méthode diffusimétrique directe, on a utilisé un enzyme purifié et liophylisé, préparé avec une souche de *B. subtilis* (13).

Les boîtes Petri contenant le milieu destiné au titrage diffusimétrique en surface, ont été préparées de la manière suivante: on a ajouté à une gélose nutritive 2%, pH = 7,0 — 7,2, fondue et refroidie à 50°C, diverses concentrations de pénicilline et 0,5% culture de 24 heures en bouillon du staphylocoque Oxford. (A la suite des résultats expérimentaux obtenus, la concentration de la pénicilline a été fixée à 0,1 U.I./1 ml gélose). Sur la boîte on a disposé ensuite des cylindres en verre à diamètre de 8 mm., dans lesquels on a introduit par 0,1 ml des dilutions croissantes de pénicillinase en tampon phosphate — pH = 7,0. Les boîtes ont été gardées pendant 3 heures à + 4°C pour la diffusion de l'enzyme et ensuite à l'étuve à 37°C. La lecture des résultats a été faite après 24 heures, en notant

le nombre des colonies de staphylocoques développées sur la surface et en profondeur de la gélose.

On a étudié diverses variantes de la méthode sus-mentionnée, telles: remplacement des cylindres en verre par des rondelles de papier filtre, addition au milieu de culture du lactose et d'un indicateur (rouge phénol ou bleu bromthymol), ainsi que la technique de la diffusion en tubes, inclusivement sa variante avec lactose et indicateur.

Comme témoin, on a choisi la méthode de titrage proposé par MARKOV et coll. (9) qui définissent comme unité de pénicillinase, la quantité minimum d'enzyme capable de détruire 100 U.I. pénicilline, au cours d'une heure, à 37°C et à pH = = 7,0. La technique du titrage est la suivante (Tableau I): à 1 ml pénicillinase (dilutions croissantes en tampon phosphate pH = 7,0), on ajoute 100 U.I. pénicilline, (même volume). Le mélange est maintenu 1 heure à 37°C, déterminant ensuite l'absence de la pénicilline par la méthode de diffusion en surface, à l'aide des rondelles de papier filtre.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La mise au point de la technique du titrage de la pénicillinase par la méthode diffusimétrique directe imposait, en premier lieu, la détermination de la quantité minimum de pénicilline nécessaire à l'inhibition totale du développement du staphylocoque Oxford en gélose sur boîtes Petri, détermination dont le résultat a indiqué la quantité de 0,02 U.I. pénicilline/ml.

En second lieu, on a essayé d'établir la limite supérieure de la concentration de pénicilline que l'on pouvait atteindre sans affecter la sensibilité de la méthode, ceci étant nécessaire en vue de diminuer les possibilités d'erreurs, assez nombreuses, lorsqu'on utilise des doses situées à la limite de la zone d'inhibition de l'antibiotique. Dans ce but, on a effectué parallèlement des titrages de la pénicillinase

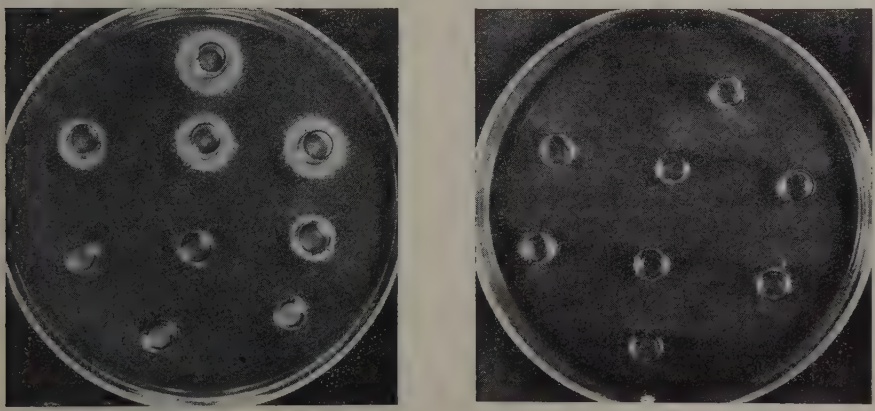


Fig. 1 Titrage de la pénicillinase par la méthode diffusimétrique directe. On observe autour des cylindres, les zones de croissance du staphylocoque, qui diminuent graduellement.

Tableau II

Résultats des titrages effectués parallèlement, par 10 fois sur le même lot de pénicillinase.

Dilution de l'enzyme	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16.384	1/32.768	1/65.536
Exp. 1	17	15	15	15	12	12	10	10	8	8	8	±	±	±	0	0
Exp. 2	17	15	15	15	12	12	10	10	8	8	8	±	±	0	0	0
Exp. 3	17	17	15	15	12	12	10	10	10	8	8	±	0	0	0	0
Exp. 4	17	17	15	12	12	12	12	10	8	8	8	±	±	±	0	0
Exp. 5	17	15	15	12	12	12	10	10	8	8	8	8	±	0	0	0
Exp. 6	15	15	15	15	15	12	10	10	10	8	8	±	±	±	0	0
Exp. 7	17	15	15	12	12	12	10	8	8	8	3	±	±	0	0	0
Exp. 8	15	15	15	15	13	12	12	10	8	8	8	±	±	±	0	0
Exp. 9	17	15	15	12	12	12	12	10	8	8	8	±	±	±	0	0
Exp. 10	17	15	15	12	12	12	12	10	8	8	±	±	±	±	0	0

Légende: = Les chiffres indiquent le diamètre de la zone de croissance abondante du staphylocoque, en profondeur et sur la surface de la gélose.
± indique un développement moins abondant des colonies de staphylocoques, sur une zone avec un diamètre au dessous de 8 mm.

par la méthode proposée, en utilisant des concentrations croissantes de pénicilline (de 0,05 U.I./ml à 1 U.I./ml). On a constaté que 0,05 U.I. et 0,1 U.I. pénicilline/ml donnent des résultats rapprochés, mais que des concentrations plus élevées de pénicilline réduisent la sensibilité de la méthode. A la suite de ces résultats, la concentration de la pénicilline en gélose a été fixée à 0,1 U.I./ml.

Un problème plus difficile à résoudre a été celui de la définition de l'unité de pénicillinase. Il va de soi qu'une nouvelle unité, en plus de celles existantes, loin d'éclaircir les choses ne ferait que les compliquer. Toutefois, il ne s'agit point d'une unité standard internationale, qui ne pourrait être basée que sur une méthode de titrage chimique (12), mais d'une unité opérative, facile à déterminer et dont l'équivalent en unités standard puisse être aisément calculé.

Afin d'établir la valeur de cette unité, il faut examiner de plus près l'aspect des boîtes de Petri qui ont servi au titrage de la pénicillinase, après incubation de 24 heures à 37° (fig. 1). Il résulte de la fig. 1 qu'en présence de fortes concentrations de pénicillinase on obtient, autour des cylindres, des zones où se développent des colonies de staphylocoques, tant à la surface qu'en profondeur de la gélose. A mesure que l'enzyme diminue en concentration, le diamètre des zones se réduit graduellement, atteignant les dimensions des cylindres; à partir de ce moment les colonies ne se développent plus que sur la partie de la gélose recouverte par les cylindres. Pour la lecture de ces résultats il est nécessaire d'éloigner les cylindres. On constate qu'en présence de dilutions plus grandes

de pénicillinase n'apparaissent que de rares colonies qui, à partir d'une certaine dilution, disparaissent totalement.

Etudiant la variation des résultats par titrages parallèles, on a remarqué (tableau II) que la dilution permettant d'obtenir des colonies isolées varie d'un titrage à l'autre plus que la dilution qui permet une croissance massive en profondeur de la gélose, limitée à l'aire du cylindre. Le diamètre des aires dépassant celui des cylindres varie également.

L'unité de pénicillinase a été définie sur la base de ces données comme représentant la quantité minimum d'enzyme capable d'inactiver la pénicilline en concentration de 0,1 U.I./ml milieu sur une aire avec un diamètre de 8 mm., c'est-à-dire qu'elle permet le développement abondant du staphylocoque dans la zone délimitée par les parois du cylindre.

L'unité ainsi établie est (suivant nos expériences) d'environ 8 à 10 fois plus petite que l'unité proposée par Markov et coll., permettant ainsi le titrage de quantités de pénicillinase plus petites que par la méthode respective.

Au cours des expériences, on a également étudié la possibilité de remplacer les cylindres de verre par des rondelles de papier filtre, ce qui a diminué la sensibilité de la méthode, motif pour lequel nous avons abandonné ce procédé.

L'addition du lactose et du rouge de phénol n'a pas contribué à faciliter l'interprétation des résultats; le bromthymol (utilisé comme indicateur) a diminué la sensibilité de la méthode.

On a essayé une modification de la méthode en utilisant la technique de la diffusion en tubes, qui a compliqué la méthode, sans en augmenter les avantages.

Finalement, nous nous sommes fixés à la méthode exposée au début de ce travail, qui est plus simple que les autres méthodes utilisées et présente la précision des méthodes biologiques qui utilisent la technique du titrage par diffusion en gel.

CONCLUSIONS

1. On propose une méthode de titrage de la pénicillinase, basée sur la diffusion de l'enzyme en gel. Le titrage est effectué en boîtes Petri avec gélose nutritive additionnée de 0,1 U. I. pénicilline/ml et d'une culture de staphylocoque Oxford, par la technique des cylindres.

2. On définit comme unité d'activité de la pénicillinase, la quantité minimum d'enzyme capable d'inactiver la pénicilline en concentration de 0,1 U.I./ml milieu sur une aire de 8 mm. diamètre, c'est-à-dire qui permette la croissance abondante du staphylocoque dans la zone limitée par les parois du cylindre.

3. La méthode proposée est simple, sensible, s'effectuant en une seule étape et exige des quantités infimes de pénicilline.

BIBLIOGRAPHIE

1. Benedict R. G., Schmidt W. H. et Coghill R. D. — Arch. Biochem., 1945, **8**, 377.
2. Henry R. J. et Housewright R. D. — J. Biol. Chem., 1947, **167**, 559.
3. Himes A. T. et White H. J. — J. Bact., 1944, **47**, 426.
4. Housewright R. D. et Henry R. J. — J. Biol. Chem., 1947, **167**, 553.
5. Iland C. N. et Baines S. — J. Path. a. Bact., 1949, **61**, 329.
6. Lahelle O. — Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1948, **25**, 444.

7. Lawrence C. A. — J. Bact., 1945, **49**, 57.
8. Lepage G. A., Morgan J. F. et Campbell M. E. — J. Biol. Chem., 1946, **166**, 465.
9. Markov W., Bardarov S. et Popov E. — Mitt. Mikrobiol. Inst. Bulg. Akad. Wissenschaften, Sofia, 1954, 5.
10. McQuarrie E. B. et Liebmann A. J. — Arch. Biochem., 1944, **5**, 307.
11. Perret C. J. — Nature (London), 1954, **174**, 1012.
12. Pollock M. R. et Torriani A. M. — C.R. Ac. Sci., Paris, 1953, **237**, 276.
13. Săsărman A., Horodniceanu T., Kranzdorf H. et Tulpan G. — Revista de Microbiol., Parazitol. Epidemiol., 1960, No. 6 (sous presse).
14. Teodorovici G. et Zingher S. — Rev. Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1958, Nr. 5, 395.

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЙНЫХ ПЕНИЦИЛЛИНАЗ

СООБЩЕНИЕ II-ОЕ. ТИТРОВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНАЗЫ ПУТЕМ ПРЯМОГО ДИФФУЗИМЕТРИЧЕСКОГО СПОСОБА.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Предлагают способ титрования пенициллиназы, основанный на диффузии энзимы в геле. Титрование проводится в чашках петри с агаром, к которому прибавляются 0,1 Е пенициллина /мл и культура стафилококка Оксфорд, применяя способ стеклянных цилиндров. Единица действия пенициллиназы определяется минимальным количеством энзимы способным инактивировать пенициллин в концентрации 0,1 Е/ мл среды, на протяжение области в 8 мм, то есть способствовать обильному развитию стафилококка в зоне, окружающей цилиндр.

Предлагаемый метод прост, чувствителен, проводится в одном приеме и применяет ничтожественные количества пенициллина.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER BAKTERIEN PENIZILLINASEN

II. MITTEILUNG. PENIZILLINASEBESTIMMUNG DURCH DIE DIREKTE DIFFUSIMETRISCHE METHODE

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bestimmung der Penizillinase wird ein Verfahren vorgeschlagen, dass sich auf die Diffusion des Enzyms in Gel gründet. Die Bestimmung wird unter Verwendung der Glasszylindermethode in Petri-Schalen, in Agar durchgeführt, dem 0,1 I. E. Penizillin pro ml und eine Kultur von Oxford-Staphylokokken zugefügt werden.

Als Wirksamkeitseinheit der Penizillinase wird die geringste Menge des Enzyms definiert, die fähig ist Penizillin in der Konzentration von 0,1 E. I./ml in einem Bereich von 8 mm zu inaktivieren, das heisst eine üppige Entwicklung des Staphylococcus in dem durch den Zylinder begrenzten Bereich zu gestatten.

Die Methode ist einfach und empfindlich. Sie kann auf einen Sitz durchgeführt werden und benötigt nur sehr geringe Penizillinmengen.

INVESTIGATIONS ON BACTERIAL PENICILLINASES

NOTE II. TITRATION OF PENICILLINASE BY THE DIRECT DIFFUSIMETRIC METHOD

SUMMARY

A method based on the diffusion of penicillinase in gels is suggested for the titration of the enzyme. The titration is carried out in Petri dishes containing agar to which 0,1 U.M. of penicillin per ml, and a culture of the Oxford staphylococcus have been added. Glass cylinders are used. The unity of penicillinase activity is defined as the minimum amount of enzyme which is able to inactivate penicillin in a concentration of 0,1 U.M. per ml of the medium over an area of 8 mm, i.e. to allow the abundant growth of the staphylococcus in the area limited by the cylinder.

The suggested method is simple and sensitive; it may be carried out in a single sitting and requires but minute amounts of penicillin.

DIAGNOSIS OF HUMAN LEPTOSPIROSIS BY THE COMPLEMENT FIXATION TEST WITH A SINGLE ANTIGEN. Note I.

by

NINA STURDZA, M. ELIAN and GERTRUDA TULPAN

(From the Dr. I. Cantacuzino Institute — Division of Leptospiroses)

— Received for publication, november 2 1959 —

The diagnosis of leptospirosis is still confined to a small number of specialised laboratories. The execution and interpretation of the agglutination-lysis test (ALT) demand skilled practice, while the manipulation of live antigens is not always free of danger. The dispatching of sera from the country to a laboratory of speciality prolongs the time limit in which it is possible to secure results which, as it is, reach the clinician rather tardily.

In order to place at the disposal of any laboratory a means of a serological diagnosis we tried the complement-fixation test (CFT) practiced since 1916 by many investigators who used different antigens (phenolated (6), boiled (12), merthiolated (9), chinosolated cultures (7), sonic-vibrated (10) or chemical extracts (2, 4, 11).

We shall not recall the history of the CFT in the diagnosis of leptospirosis. Let us mention only that FÜHNER (5) continuing GAEHTGEN'S investigations considers it useful and associated it to the agglutination-lysis test in order to differenciate recent cases from older ones.

The use of a number of antigens equal to that employed in the ALT, as recommended by VARFOLOMEEVA (13) may rightly meet with the objection that the number of tubes, time, and manipulation, make of this test a most elaborate one (8).

MUSAEV (7) successfully tried mixtures of centrifugated cultures as a polyvalent antigen in the diagnosis of leptospirosis in animals by the CFT. This mixture however lowers the specific titre of the antigen.

The observations made at the Laboratory of Leptospiroses of the "Cantacuzino" Institute (3) that the *L. biflexa* Patoc strain (isolated from water by BABUDIERI) is frequently coagglutinated by human sera, positive to different types of pathogenic leptospira, as well as the results obtained by COX (4) with *L. biflexa* from which he extracts a sensitizing polyvalent antigen for sheep red cells, determined us to try the CFT with an antigen prepared from such a strain.

To this end we examined comparatively 369 sera by the agglutination-lysis and complement-fixing tests with an antigen prepared from the *L. biflexa* Patoc strain.

MATERIAL AND METHODS

Material.

A. *The antigen.* For the preparation of the antigen we used the *L. biflexa* Patoc strain, received from B. BABUDIERI in 1957. This non-pathogenic strain develops rapidly and abundantly. Cultures of 10 to 12 days in 15 ml Korthof medium (18/18 tubes) incubated at 28°C were centrifuged at 4000 r.p.m. for one and a half hour. The sediment was retaken in merthiolated physiological saline 1/10.000 (1/20 of the initial volume) and stored at +4°C. This antigen was titrated against the homologous serum after 48 hours and 5 months following its preparation. Four lots of antigen were prepared with the following fixing titres: 1/32, 1/64 and 1/128, which remained stable until the 6th month after preparation (last titration).

B. *Sera.* In preliminary investigations have been tried:

— 13 type specific immune sera, prepared on rabbits during the years 1956—1958;

— 26 human sera, positive to the agglutination-lysis test (kept at +4°C since 1954—1958);

— 20 horse sera of which 16 with a positive ALT (1959);

— 26 hog sera, of which 25 with a positive ALT (1959);

Actual investigations effectuated between May—October 1959, comprise the parallel study by CFT and ALT of 369 human sera, and namely:

a) 136 test sera:

— 50 samples obtained from 47 cases of febrile diseases with no specified diagnosis;

— 15 samples from pregnant women;

— 35 samples from 35 human infections due to epidemic hepatitis;

32 samples from 32 syphilitic cases with intensely positive Bordet-Wassermann reactions.

4 samples from malaria patients.

b) 232 sera obtained from 125 patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. Out of these 125 cases, 81 were studied dynamically at different intervals since onset of disease by 2 to 5 successive examinations (188 sera) while the remaining 41 cases were examined by a single serological examination.

Procedure.

The ALT was carried out by the rapid method of agglutination on slides, with live strains belonging to the following types *):

L. icterohaemorrhagiae Wijnberg	*L. hyos* (mitis Johnson)
L. canicola Utrecht	*L. australis* A Ballico
L. grippotyphosa Moscow	*L. autumnalis* Akijami AB
L. sejroe M 84	*L. batavia* Swart, v. Tienen
L. hebdomadis	*L. ballum* M 127
L. pomona	*L. javanica* poi

As we had not the possibility to try isolations of leptospirae from the examined patients, we considered as proven cases those with rising agglutinin titres

*) Strains obtained in 1956 from Prof. Wolff. Amsterdam.

and as probable cases, those undergoing a single examination, in which either both tests or only the CFT proved positive.

2. For the CFT we used IDA BENGTSON'S technique (6) which is well known to the physicians of our field laboratories. The sera were inactivated for 30 minutes at 56°C and then followed by twofold dilutions, starting with the dilution 1/4*). For the reaction 4 Units antigen, and 2 Units of complement diluted in a volume of 0,2 ml were used.

After incubation of one hour at 37°C, the haemolytic system is added. Reading after 2 and 18 hours at room temperature.

As positive were registered only the dilutions with a minimum fixation of + + +).

When the control sera did not show an anticomplementary capacity in dilutions 1/4 and 1/8, even these titres were considered significant, if on subsequent examinations they increased.

RESULTS

A. *Preliminary investigations.*

a) Immune rabbit sera revealed the following CFT titres in presence of *L. biflexa* Patoc antigen:

anti-Patoc serum	Titre 1/4096	anti-pomona	Titre 1/64
anti-icterohaemorrhagiae	Titre 1/8	anti-grippotyphosa	Titre 1/64
anti-poi	Titre 1/256	anti-hebdomadis	Titre 1/32
anti-canicola	Titre 1/64	anti-sejroe	Titre 1/256
anti-ballum	Titre 1/256	anti-bataviae	Titre 1/64
anti-autumnalis	Titre 1/128	anti-mitis	Titre 1/64
anti-australis	Titre 1/128		

b) The positive human sera stored 1 to 4 years at +4°C and retitrated by the CFT and ALT, gave the following results:

— 15 sera were positive both in the ALT (1/400—1/6400) and CFT (1/32—1/64);

— 10 sera with agglutination titres of 1/100—1/1600 failed to fix the complement in presence of *L. biflexa* Patoc antigen.

One serum was negative to both the ALT and CFT (this may be due to the long storage at +4°C).

c) None of the examined horse and hog sera showed a positive CFT, although many possessed agglutinins. It is not known if the infections were recent or not.

The results obtained by preliminary investigations on old human sera and animal sera were not conclusive. Inquiries were therefore continued on sera collected from patients hospitalized between May—October 1959 with a clinical diagnosis of leptospirosis.

B. *Investigations carried out on sera collected in 1959.*

The 136 non-leptospiral human sera, collected in 1959, proved negative to both agglutination-lysis and complement fixation tests, not fixing the complement in presence of *L. biflexa* Patoc antigen, not even in the first 1/4 dilution.

*) The first examination by the CFT was carried out up to the dilution 1/64 of the sera. The majority of the sera were repeated, the dilutions of serum being continued up to the final titre. A number of 14 sera which could not be repeated kept the final titre 64.

During the summer months of 1959, 125 patients clinically suspected of leptospirosis gave positive serological reactions.

These 125 cases were subdivided as follows:

1. Eighty-one cases examined by repeated tests (188 sera) yielded positive reactions of agglutination-lysis. Two of them showed a stationary or decreasing agglutinative titre for *L. mitis*, and were labelled as old cases or with anamnestic reactions (the serological tests repeated at intervals of 7 to 10 days remained constantly negative to the CFT). These two cases have not been included amongst the positive ones. The remaining 79 cases have been considered as serologically confirmed cases of leptospirosis.

2. A number of 44 cases, submitted to a single serological test remained doubtful, though for many of them the agglutination-lysis and complement fixation titres plead in favour of a diagnosis of leptospirosis.

Determination of types according to the maximal agglutinin titre is but relative, as the paradoxical reaction described by FÜHNER, often exceeds three weeks from onset (9 out of 89, or 21% sera examined between the 3rd and 9th week showed either the same titre for two different types, or a maximal titre for another type than the one found in the last examination). Another fact which contributes to the non-specific shift in titres is the hypersensitivity of some strains (i.e. *L. sejroe*, which react earlier and at high titres with positive sera for other types).

The 123 cases were grouped according to the results obtained by the ALT (table I).

Table I

Types of Leptospira studied

(The type of leptospira was reckoned according to the maximum agglutination titre of the sera)

Leptospira types calculated according to maximal agglutin. titre.	L. pomona	L. sejroe	L. ballum	L. ictero-haem	L. hebdo-madis	L. bataviae	L. mitis	L. canicola	L. grippo-typhosa	Undeter-mined type
Cases with repeated examinations. Serologically confirmed leptospiroses.	34	17	—	4	3	2	2	1	—	16
Cases with a single exam.	9	11	1	—	1	—	2	2	4	14

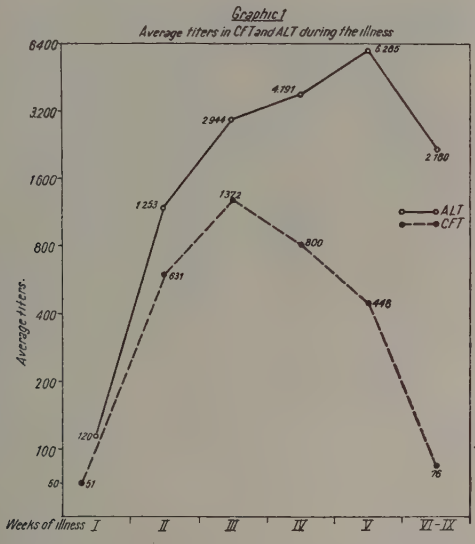
Out of these 123 cases, 44 were suspected cases (single examination) and 79 proven cases (increasing titres).

We give here below the results obtained in these cases by the CFT and ALT.

1. *Fourty-four cases submitted to a single examination.* The single samples of sera — mostly forwarded from the country — often lacked the indication of onset of disease (for 13 out of 44 the date of collection was estimated approximately within the first and second week).

Fourteen of 19 cases examined in the first week, gave positive results for both reactions with titres oscillating between 1/100—1/3200 for the ALT, and 1/32—1/4096 for the CFT; 4 cases were negative to the agglutination-lysis but positive to the complement-fixation, with titres ranging from 1/16 to 1/64. A positive ALT serum 1/100, (L. grippotyphosa), showed a negative CFT.

Of 18 cases examined in the second week of illness, 17 proved positive for both reactions with titres from 1/100 to 1/6400 for the ALT, and 1/32 to 1/16.384 for the CFT; one case showed a positive ALT titre (1/400) for *L. pomona*, and *L. autumnalis* and a negative CFT.



Out of 5 cases examined in the 3rd week, 4 proved positive to both tests (ALT 1/200—1/25.600, and CFT 1/8—1/1024) and one case (L. ballum) with an ALT titre 1/200, yielded a negative CFT.

One case examined in the 4th week *(L. sejroe)* gave an ALT titre 1/100, and a CFT titre 1/32.

One case examined after the 5th week showed an ALT titre of 1/25.600 for *L. canicola*, and a CFT titre of 1/64.

In conclusion in these 44 cases the CFT concorded with the ALT in 37 cases (86.36%). The CFT proved positive in 41 out of 44 cases (93,18%) and the ALT was positive in 40 out of 44 cases (90,90%).

2. *Seventy-nine cases submitted to* 2—5 *successive serological examinations.* The results obtained in these examinations are shown in table II in which are exposed the number of sera controlled between the first and the 9th week from onset of disease with a percentage of positivity obtained in both tests. The agglutination titres oscillated from 1/100—1/25.600, and the fixation titres between

Table II

Weekly evolution of the CFT and ALT (79 confirmed cases with repeated serological examinations)
183 sera samples

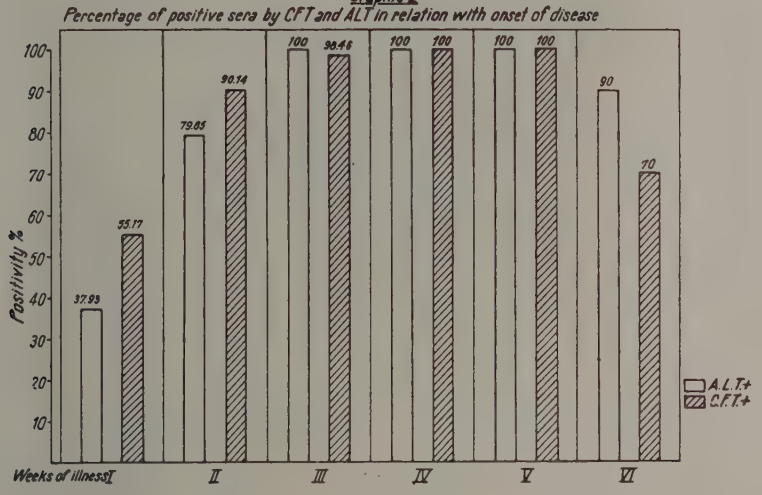
Week of disease	Examined sera	Total positive reactions	%	Positive sera in both tests	%	Negative sera in both tests	%	Total number of positive CFT sera	%	Total number of positive ALT sera	%	Positive ALT negative CFT	%	Positive CFT negative ALT	%	Limit titres of ALT	Limit titres of CFT
I	29	17	58,62	10	34,48	12	41,37	16	55,17	11	37,93	1	3,44	6	20,68	1/100— 1/6400	1/4— 1/4096
II	71	64	90,14	56	78,87	7	9,85	64	90,14	54	79,65	0	0	8	11,26	1/100— 1/6400	1/4— 1/8192
III	54	54	100	53	98,14	0	0	53	98,14	54	100	1	1,85	0	0	1/200— 1/12.800	1/8— 1/8192
IV	12	12	100	12	100	0	0	12	100	12	100	0	0	0	0	1/200— 1/6400	1/16— 1/4096
V	7	7	100	7	100	0	0	7	100	7	100	0	0	0	0	1/800— 1/25.600	1/64— 1/4096
VI-IX	10	9	90	7	70	1	10	7	70	9	90	2	20	0	0	1/200— 1/12.800	1/16— 1/128
Total	183	163	89,07	145	79,23	20	10,92	159	86,88	147	80,32	4	2,18	14	7,65		

1/4—1/8192. The titres 1/4 (2 sera) and 1/8 (4 sera) have been considered as being significant, owing to the fact that subsequent specimens became positive to the ALT, while the titre of the CFT increased to over 1/64.

In graphic 1 are given the curves representing the average of titres (ALT and CFT) in relation to the week of disease.

It may be seen from this graphic that the average of the agglutinin titre reaches its peak in the 5th week of illness, while that of the fixation antibodies reaches it in the 3rd week.

Graphic 2



In table III are exposed some of the cases of each of the types studied by repeated examinations, in order to show the evolution of the titres of both tests, and mention as well one of the two *mitis* cases in which the CFT proved negative while the ALT decreased (anamnestic reaction).

The concordance of the CFT and ALT was 79,23% of the total examinations. Whereas only in two cases a positive ALT preceded a positive CFT, in 14 cases the CFT was positive before the ALT. Among the 44 cases with a single examination, three had a positive ALT and a negative CFT. Supposing these to have been recent cases, the CFT with *L. biflexa* Patoc antigen can be negative in cases of leptospirosis in a rate of 3,08%. In exchange, in 18 serological samples (including as well the cases submitted to a single test) positive CFT preceded the ALT in a proportion of 7,92%. The CFT appears therefore to be more sensitive than the ALT. In any case, during the first two weeks of illness, the CFT preceded the ALT as can be seen from table II and graphic 2.

The single case of *L. canicola* repeatedly examined, seems to demonstrate a weaker sensitivity of *L. biflexa* Patoc antigen in human cases due to this type.

Table III

Some cases observed by successive examinations (ALT$^{+)}$ and CFT titres)

No. case	ALT	CFT	ALT	CFT	ALT	CFT	ALT	CFT
	5th day		15th day					
650 B.P.	0	0	p. 1/1600 s. 1/200 at. po. } 1/100 IH.	1/2048				
	6th day		11th day		23d day			
605 N.I.	p. s. } 1/100	1/32	p. 1/1600 at. po. } 1/800 IH. gr. s. } 1/200	1/512	p. 1/6400 at. 1/1600 IH. s. } 1/200 gr.	1/512		
	8th day		13th day		29th day			
726 B.I.	0	1/8	s. 1/3200 h. 1/100	1/1024	s. 1/1600	1/512		
	12th day		18th day					
645 S.V.	s. 1/800	1/1024	h. 1/800 s. 1/400	1/4096				
	2nd week		23d day					
935 C.A.	bt. 1/800 bl. } 1/6400 s.	1/1024	bt. 1/3200 s. 1/800	1/4096				

	13th day		26th day		44th day			
621 S.A.	IH. 1/3200 s. } 1/200 bl. } po. 1/100	1 1/4096	IH. 1/6400 s. 1/1600 bl. 1/400 po. 1/100	1/256	IH. 1/12800 s. 1/1600 po. 1/800 c. } 1/200 at. }	1/128		
	7th day		13th day					
450 P.I.	0	1/16	m. 1/6400 s. 1/3200 bl. } po. } 1/400 c. }	1/512				
	16th day		18th day		26th day		45th day	
637 I.M.	c. 1/1600 IH. 1/400 bl. 1/800	0	c. } bl. } 1/800 IH. 1/200	1/16	c. } bl. } 1/3200 IH. 1/800	1/8	c. 1/3200 bl. 1/1600 IH. 1/400	0
	10th day		18th day		30th day			
647 I.I.	s. 1/200 p. 1/100	1/2048	s. } p. } 1/1600 at. } bl. } 1/200 po. } IH. 1/100	1/8192	s. } p. } 1/800 po. 1/100	1/1024		
	6th day		14th day		17th day			
347 D.C.	m. 1/800	0	m. 1/800	0	0	0		

[2]) L. icterohaemorrhagiae = IH; L. canicola = c.; L. grippotyphosa = gr.; L. sejroe = s.; L. hebdomadis = h.; L. pomona = p.; L. bataviae = bt.; L. autumnalis = at.; L. ballum = bl.; L. poi = po.; L. mitis = m.

Nevertheless, among the cases submitted to a single test, two showed agglutinin titres of 1/1600 and 1/25.600 for *L. canicola*, and a CFT at 1/64. Control of a great number of cases would be needed to verify the polyvalence of this antigen.

DISCUSSIONS

The possibility of a serological method for the diagnosis of leptospirosis at hand to every laboratory physician is not without importance.

The obvious parallelism between the CFT and ALT positivity in cases clinically suspected of leptospirosis, as well as the high titres and precocity of the CFT, although a heterologous antigen is used, plead in favour of the group specificity of this antigen, and for the practical value of the CFT in the diagnosis of "leptospirosis."

It is understood that the control of this antigen on a greater number of sera (normal individuals or diseases other than leptospirosis) as well as its control on other types of human leptospirosis is indispensable.

If this concerns a strain possessing a great antigenical polyvalency or a common somatic antigen, remains a problem for future research in which in addition to the chemical study, will be necessary to study other saprophytic as well as pathogenic strains.

Our investigations show that the use of this single antigen is sufficient for the detection of a minimum of 8 leptospiral sero-types (the most frequent in Roumania). It seems likely that the *L. biflexa* Patoc antigen will also give positive results in cases due to the *L. autumnalis* type, the *L. biflexa* Patoc being antigenically related to the pathogenic types *L. semarang* and *L. autumnalis* (3).

The results obtained show that the CFT (prepared with the Patoc antigen) is more precocious, and at least as sensitive as the ALT, possessing the advantage of not registering old cases, which from the clinical and epidemiological viewpoint is important.

Preparation of the antigen presents no difficulty, as the non-pathogenic *L. biflexa* Patoc strain grows rapidly and abundantly in culture media, and the antigen obtained is sufficiently concentrated in order to give high titres. The fact that it keeps its titre at least 6 months (date of last control) allows preparation to be made twice a year or even only once, in the summer season, when the most frequent cases appear.

District and city laboratories will be able to resolve doubtful cases by their own means, the positive CFT sera remaining to be forwarded to specialised laboratories for determination of type.

The behaviour of animal sera in presence of this antigen, remains to be studied.

The fact that the diagnosis of leptospirosis can be effectuated with the help of a saprophytic strain, shows once more the antigenic relationship between the groups of saprophytic and pathogenic leptospira, and raises the question of the common origin of pathogenic leptospira.

REFERENCES

1. Bengtson I. — Proc. Soc. exp. Biology and Medicine, 1941, **46,** 665.
2. Carlinfanti E. — Zeitschrift f. Immunitätsforschung, 1938, **94,** 426.
3. Combiescu D., Sturdza N., Sefer M., Radu I. — Zblt. Bakt. Orig. 1958, **173,** 103.
4. Cox C. D., Stover R. C., Treik R. W. — Proc. exp. Biol a. Medicine, 1958, 98/2, 265.
5. Fuhner F. — Communications des invités étrangers. Congrès National des Sciences Médicales, Bucarest, 5—11 Mai, 1957, 637—643.
6. Gachtgens W. — Klin. Wschrft., 1933. 697.
7. Musaev M. A. — Veterinaria, 1948, No. 12, p. 22.
8. Organisation Mondiale de la Santé — Série Rapp. Technique, 1956, No. 113.
9. Pike R., Owens H., Hunes W., Tex D. — J. Lab. Clin. Med., 1954, **44,** 609.
10. Randall R., Wetmore P. W., Warner Jr. — J. Lab. Clin. Med., 1949, **34,** 1411.
11. Schneider M. D. — Exp. Parasitol., 1955. **4,** 107.
12. Terzin A. L. — J. Immunology, 1956. **76,** 366.
13. Varfolomeeva A. — Leptospirozele omului (Human Leptospirosis) 1948, Moscow Ed. Medghiz.

ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА С ЕДИНСТВЕННЫМ АНТИГЕНОМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изготовлен концентрированный, обработанный мертиолатом антиген из штаммов L. biflexa Patoc (выделенной Б. Бабудиери) способный связывать комплемент в присутствии сывороток больных лептоспирозом L. pomona, L.sejroe, L. hebdomadis, L. mitis, L. icterohaemorrhagiae, L. canicola, L. bataviae i L. grippotyhosa.

Контроль реакции связывания комплемента при помощи данного антигена проводился сравнительно с реакцией агглютинации-лизиса на 125 сыворотках, из которых 81 изучались путем последовательных серологических исследований.

135 образцов сыворотки, происходящих от больных другими заболеваниями дали отрицательные реакции связывания с тем же антигеном.

В 79 случаях из 81, изученных в динамике (188 исследованных сывороток), связывающие комплемент и агглютинирующие титры постепенно повышались и Р.С.К. соответствовала Р.А.Л. в 79,23% исследований. 2,19 образцов были положительными только в Р.А.Л., а 7,65% образцов были положительными исключительно в Р.С.К.

При применении только Р.А.Л. диагностика была-бы установлена в 80,32% образцов, в то время как только Р.С.К. об: словила-бы положительные результаты с 86,88% образцов.

Из полученных результатов следует, что в начале болезни Р.С.К. чувствительнее, чем Р.А.Л. Расхождение стирается на 3-ей, 4-ой и 5-ой неделе и появляется вновь, на этот раз уже в пользу Р.А.Л., после 26-ой недели заболевания.

Применение Р.С.К. в диагностике леетоспироза — без определения типа — доступно каждому лабораторному врачу, причем для установления типа, сыворотки следует отослать в лаборатории по специальности.

DIAGNOSTIC DES LEPTOSPIROSES CHEZ L'HOMME PAR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT PAR UN SEUL ANTIGÈNE

RÉSUMÉ

On a préparé avec la souche *L. biflexa* Patoc (isolée par Babudieri) un antigène concentré, merthiolé, capable de fixer le complément en présence des sérums des malades infectés avec *L. pomona, sejroe, hebdomadis, mitis, icterohaemorrhagiae, canicola, batavia* et *grippotyphosa.*

Le contrôle de la réaction de fixation du complément a été effectué comparativement à la réaction d'agglutination-lyse sur 125 cas, dont 81 ont été poursuivis par examens sérologiques successifs.

Des échantillons provenant de 136 malades qui présentaient d'autres maladies que la leptospirose, ont donné avec le même antigène des réactions de fixation négatives.

Dans 79 cas poursuivis par examens sérologiques répétés (188 sérums examinés) les titres fixateurs de complément et agglutinants ont évolué progressivement, la RFC étant concordante avec la RAL dans 79,23% des examens. Un pourcentage de 2,18 des échantillons a été positif seulement pour la RAL, et 7,65 positif exclusivement par la RFC. L'emploi de la RAL seule aurait permis le diagnostic de 80,32% des cas, tandis que par la RFC, 86,88% des échantillons auraient donné des résultats positifs.

Il ressort qu'au début de la maladie la RFC est plus sensible que la RAL. Le décalage s'atténue dans la 3-e, 4-e et 5-e semaine, pour réapparaître — cette fois en faveur de la RAL — après la 26-e semaine.

L'emploi de la RFC pour le diagnostic de la leptospirose — sans déterminer le type — peut être facilement utilisé par n'importe quel médecin de laboratoire, les sérums trouvés positifs devant être expédiés aux laboratoire de spécialité pour établir le sérotype.

DIE DIAGNOSE DER MENSCHLICHEN LEPTOSPIROSEN DURCH DIE KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION MIT EINEM EINZIGEN ANTIGEN

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Stämmen von *L. biflexa* Patoc (von B. Babudieri isoliert) wurde ein konzentrierte-Antigen, mit Merthiolatzusatz hergestellt. Dieses Antigen ergab positive Komplementbinsdungsreaktionen (KBR) mit den Sera von Patienten, deren Erkrankung durch *Leptospira, pomona, sejroe, hebdomadis, mitis, icterohaemorrhagiae, canicola, bataviae* und *grippotyphosa* hervorgerufen worden war.

Die KBR mit diesem Antigen wurde durch Vergleich mit der Agglutination-Lysereaktion (ALR) in 125 Fällen kontrolliert. Bei 81 dieser Fälle wurden wiederholte serologische Untersuchungen durchgeführt.

Das Antigen gab negative KBR mit 136 Serumproben von Patienten, die an anderen Krankheiten litten.

Bei 79 von 81 dynamisch verfolgten Fällen (188 untersuchte Sera) stiegen sowohl der Komplementbindungs- als auch der Agglutinationstiter fortlaufend an und die KBR stimmte bei 79,23% der Proben mit der ALR überein; bei 2,18% der Proben war nur die ALR positiv und bei 7,65% nur die KBR. Bei ausschliesslicher Verwendung der ALR wäre die Diagnose bei 80,32% der Proben gestellt worden und bei ausschliesslicher Verwendung der KBR, bei 86,88%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass am Anfang der Krankheit die KBR empfindlicher ist als die ALR. Der Unterschied verschwindet während der 3.und 5. Woche und tritt nach der 26. Woche wieder auf, diesmal aber zugunsten der ALR.

Die KBR zur Diagnose der Leptospirose (ohne Typenbestimmung) ist in jedem Laboratorium durchführbar. Positive Sera können dann, zur Typenbestimmung, an Fachlaboratorien weitergeleitet werden.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES SOUCHES DE *MYCOBACTÉRIES SAPROPHYTES* ET *ATYPIQUES*

NOTE I. ÉTUDE DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES, CULTURELS, BIOCHIMIQUES ET DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

par

SILVIA EUSTATZIOU, EUGENIA MEITERT, GERTRUDA TULPAN, MARIA ANTOHI et G. EUSTATZIOU

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 18 avril 1960 —

Dans la littérature on trouve des essais effectués en vue de répartir les bactéries acido-résistantes par groupes. Ainsi, THOMSON (1932)(1), GORDON (1937)(2) et GORDON et HAGAN (1938)(3) ont essayé de les grouper selon leur rythme de multiplication, la température d'incubation et les réactions biochimiques.

G. PINSO, en 1950 (4), a essayé de classer les bactéries paratuberculeuses en 4 groupes distincts, selon les critériums: sensibilité aux différentes doses de PAS, présence et couleur du pigment, température maximum de développement, facteurs de croissance exigés, utilisation des hydrates de charbon et détermination phagique.

GORDON et SMITH (5, 6) ont réussi en 1953 et 1955, à classer 68% des souches étudiées en 3 espèces: *Myc. phlei*, *Myc. smegmatis* et *Myc. fortuitum*, utilisant les tests suivants: développement à certaines températures, survie à 60° pendant 4 heures, fermentation des carbohydrates, hydrolyse de l'amidon, décomposition de la gélatine, caséine et de la tyrosine, utilisation du citrate, succinate et benzoate de sodium, ainsi que le développement sur milieux à NaCl 5 et 7%.

A part les *mycobactéries* dénommées *saprophytes*, la littérature de spécialité cite de plus en plus souvent des cas de tuberculose pulmonaire dont on a isolé des mycobactéries atypiques, qui du point de vue morphologique et culturel ressemblent aux mycobactéries saprophytes (7).

Ainsi, la proportion des souches de *Mycobactéries atypiques* isolées ces 3 dernières années au laboratoire de l'Institut de Phtisiologie de Bucarest, est de 10% (NASTA et BOGDANESCO, 1959(8), BOGDANESCO, 1959(9). La fréquence, toujours plus élevée de ces souches a formé le sujet de nombreuses communications (Congrès de Phtisiologie d'Istambul (8, 10, 11)).

RUNYON (1959) (11), n'admet plus la répartition des bactéries acido-résistantes en espèces pathogènes et saprophytes; en attendant une nouvelle détermination taxonomique des *Mycobactéries*, il propose leur classification provisoire en 4 groupes:

Groupe I — photochromogènes, comprenant les *Mycobactéries « S »*, blanc — grisâtre, qui se pigmentent en jaune-citron seulement après exposition à la lumière.

Groupe II — scotochromogènes, comprenant les *Mycobactéries* à pigment orange qui apparaît dans l'obscurité, dès l'isolement.

Groupe III — non-photochromogènes, comprenant les *Mycobactéries* non-pigmentées, qui ressemblent au *Mycobactérium avium.*

Groupe IV — *Mycobactéries* qui se développent en 3—5 jours à la température de la chambre.

Le problème de la taxonomie des bactéries acido-résistantes, autres que le bacille Koch, ainsi que leur rôle dans l'étiologie de la tuberculose humaine, sont encore à l'étude.

* * *

La présente note est consacrée à l'examen des caractères morphologiques, culturels, biochimiques et de la sensibilité aux antibiotiques de 39 souches de *Mycobactéries saprophytes* de la collection de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino» de provenance différente et de 13 souches de *Mycobactéries atypiques*, isolées à l'Institut de Phtisiologie de Bucarest. En plus, on a étudié la sensibilité aux antibiotiques de 7 souches de *Myc. avium*, ainsi que des souches de *Mycobactéries types : H_{37} Rv, H_{37} Ra, Ratti.*

L'étude des systèmes phago-bactériens et de la pathogénité de ces mêmes souches, afin d'établir les corrélations entre les espèces des Mycobactéries, font l'objet d'une communication ultérieure.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. On a étudié 39 souches de *Mycobactéries saprophytes* de provenance différente:

Souche	Provenance	Dans notre collection depuis:
Myc. crottin	Rome	1951
Myc. crottin	Paris	1956
Myc. phlei	Paris	1956
Myc. phlei	Paris	1957
Myc. phlei crottin 5	Rome	1958
Myc. pellegrini	Rome	1951
Myc. pellegrini	Paris	1956
Myc. pellegrini	Paris	1957
Myc. pellegrini	Rome	1958
Myc. pellegrini 5	Bucarest	(souche ancienne de Laboratoire)
Myc. 1471	Londres	1932
Myc. smegmatis	Rome	1951
Myc. smegmatis 99	Jena	1955
Myc. smegmatis 345	Jena	1955
Myc. smegmatis 365	Paris	1956
Myc. smegmatis 909	Paris	1957
Myc. smegmatis	Paris	1957
Myc. smegmatis S_1	Rome	1958
Myc. smegmatis Washington	Rome	1958
Myc. smegmatis SA_7	Bucarest	1958
Myc. smegmatis SA_8	Bucarest	1958
Myc. friburgensis	Rome	1951
Myc. friburgensis	Paris	1957

Souche	Provenance	Dans notre collection depuis:
Myc. rabinowitchi	Rome	1951
Myc. rabinowitchi	Paris	1956
Myc. rabinowitchi	Paris	1957
Myc. rabinowitchi	Rome	1958
Myc. butyricum 99	Jena	1955
Myc. butyricum 133	Lausanne	1951
Myc. ranae	Lausanne	1950
Myc. nayaoma Ny 14	Paris	1957
Myc. milk moelleri	Paris	1957
Myc. moelleri 26	Lausanne	1950
Myc. milch	Rome	1958
Myc. grassbergeri	Lausanne	1950
Myc. 607	Rome	1958
Myc. minetti	Rome	1958
Myc. battaglini	Rome	1958
Myc. thamnopheos	Lausanne	1950

et 13 souches de *Mycobactéries atypiques* (73, 74, 83, 94, 100, 103, 104, 61, 82, 101, 39, 35A, 12A) isolées en 1959 des produits pathologiques provenant des malades de l'Institut de Phtisiologie-Bucarest:

— 2 souches (39 et 35A) isolées de deux cas de tuberculose génitale (sang menstruel); 1 souche (73) d'une pièce d'exérèse; 10 souches provenant des crachats et lavages bronchiques.

Six de ces souches (94, 101, 100, 61, 82, 73) ont été isolées des malades traités avec des tuberculostatiques, 4 souches (12A, 83, 74, 104) des malades non-traités et trois (35A, 39, 103) provenant de l'ambulatoire de l'Institut de Phtisiologie.

Sept souches de *Mycobacterium avium* ainsi que 3 souches de *Mycobacterium types: H_{37} Rv, H_{37} Ra, Ratti*, étudiées dans un travail antérieur, ont été testées seulement du point de vue de leur sensibilité aux antibiotiques (PAS, streptomycine et hydraside de l'acide isonicotinique).

II. *Milieux de culture* (GORDON et SMITH 5, 6)

1. Bouillon nutritif (peptone — 5 g, extrait de viande — 3 g, eau distillée — 1000 ml, pH = 7).
2. Agar nutritif (bouillon nutritif additionné de 1,5% agar).
3. Bouillon glycérol (bouillon nutritif + 7% glycérol).
4. Agar-extrait de terre (peptone — 5 g, extrait de viande — 3 g, agar 15 g, extrait de terre 1000 ml pH = 7).

L'extrait de terre a été préparé par autoclavage (1 heure à 121°C) de 1000 g terre séchée à l'air, passée au tamis (typhon), mélangée à 2400 ml eau de robinet, décantée et filtrée sur papier.

5. Agar glycérol (agar nutritif + 7% glycérol).
6. Agar-extrait de terre + 7% glycérol.

III. *Méthodes employées. L'examen microscopique* des cultures a été effectué sur frottis colorés à la fuchsine aqueuse et coloration Gram. L'acido-résistance des cultures sur agar-glycérol a été déterminée après 5 jours d'incubation à 28° C (Ziehl-Neelsen).

L'aspect microscopique de la morphologie des colonies a été examiné sur des préparations traitées comme suit: à 2 ml agar-glycérol fondu et ramené à 50°,

on a incorporé quelques gouttes de la suspension microbienne à étudier. Une goutte de ce mélange a été déposée (manipulation aseptique) sur un porte-objet (stérile) et incubé à 28°C dans des boîtes Petri humides, examen microscopique après 3 à 7 jours.

Le développement à diverses températures des mycobactéries a été testé sur tubes d'essai avec agar-glycérol incliné et placés immédiatement à l'étuve, à différentes températures constantes d'incubation (14°, 40°, 45° et 52°C). Le degré de développement de la culture a été noté après 7 à 14 jours d'incubation.

La survie à 60°C a été examinée après maintien des sous-cultures sur agar-glycérol à la température de 60° (bain-marie) pendant 4 heures, refroidies immédiatement et ensuite incubées 2 semaines à 28°.

L'acidification des carbohydrates a été effectuée sur milieu solide d'Ayers, Rupp et Johnson (1919) (13), milieu à base d'azote anorganique. On a étudié la réaction du glucose, rhamnose, xylose, arabinose, mannose, galactose, mannite, sorbite, inosite, dulcite, lactose, raffinose, maltose et tréhalose. L'ensemencement du milieu se fait par piquage; lecture après 7—28 jours d'incubation à 28° C.

L'hydrolyse de l'amidon a été déterminée d'après la technique de Kellerman et McBeth (1912) (12).

L'hydrolyse de la gélatine a été effectuée selon la technique de Frazer (1936 (14).

La décomposition de la caséine a été étudiée selon la méthode de Hastings (1903) (15).

La décomposition de la tyrosine a été effectuée par ensemencement de boîtes d'agar-tyrosine 5 g%, examinées du point de vue de la décomposition des cristaux de tyrosine autour et au-dessous des colonies après 14 et 21 jours d'incubation à 28°C.

L'utilisation du citrate, succinate et benzoate de sodium a été déterminée sur le milieu de Koser (1924) (16), modifié par Gordon-Smith (1953) (5).

La réduction des nitrates en nitrites a été effectuée d'après la technique de Conn (1951) (17).

La réaction de la catalase a été déterminée sur une suspension de *Mycobactéries* en eau albumineuse (une anse de culture jeune pour 1 ml d'eau albumineuse 5%), à laquelle on a ajouté 1 ml solution de perhydrol 30%. La lecture se fait après 3—5 minutes; le dégagement des bulles indique la présence de la catalase.

La tolérance au NaCl a été étudiée sur bouillon-glycérol avec 5% et 7% NaCl (tubes d'essai). Après 14 à 28 jours d'incubation à 28°C, le développement a été comparé à une culture-témoin.

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée en utilisant: pas (10, 100, 500 gamma/ml), l'hin (1, 5, 10, 100 gamma/ml) et la stréptomycine (10, 20, 100 gamma/ml), incorporés au milieu de Loewenstein et agar-glycérol.

Pour les souches atypiques on a utilisé en plus la chloromycétine et la terramycine (1, 5, 10 gamma/ml), ainsi que le produit TB_1 (0,5, 1 et 5 gamma/ml). Pour chaque souche on a utilisé 2 témoins. Les tubes ont été ensemencés avec 0,5 ml d'une suspension de germes faiblement opalescente; la lecture a été faite après 48 heures d'incubation à 37° pour les saprophytes et après 7—10 jours pour les *mycobactéries typiques* et *atypiques* et les *M. avium*.

RÉSULTATS

Étude comparative des souches

A. De l'étude des 39 souches de *Mycobactéries saprophytes*, effectuée selon le schéma de GORDON et SMITH (1953—1955) on constate que 79,6% de ces souches ont été classées comme suit: espèce *phlei* — 5 souches (12,8%); espèce *smegmatis* — 25 souches (64%); espèce *fortuitum* — 1 souche (2,8%) (Tableau I). Un nombre de 6 souches — 5 souches « *pellegrini* » et la souche 1471 (15,3%) forment un groupe différent des espèces décrites dans le schéma de GORDON ET SMITH; 2 souches (5,10%) n'ont pu être classées dans aucune des espèces décrites.

Souches encadrées dans l'espèce M phlei:

Myc. crottin Rome 1951
Myc. crottin Paris 1956
Myc. phlei Paris 1956
Myc. phlei Paris 1957
Myc. phlei crottin 5 Rome 1958.

Ces 5 souches qui reviennent à l'espèce *phlei* présentent les caractères suivants:

Morphologie: bacilles variant comme forme et dimension: coccoïdes et courts ou allongés et plus minces, Gram-positifs, acido-résistants (80—100%).

Cultures: Se développent bien sur agar, agar-glycérol et spécialement sur agar-extrait de terre glycérol; en bouillon-glycérol: voile. Microscopiquement, colonies « S », filamenteuses ou bien à surface et marges irrégulières. Aspect macroscopique: sur agar-glycérol, après 2—4 jours d'incubation, cultures fines « S » et cultures sèches « R », étendues sur toute la surface du milieu, de couleur jaune-pâle, devenant après 2 semaines abondantes et de couleur jaune-orange. *Température:* se développent à 28°, 37°, 40°, 45° et 52°; résistent 4 heures à 60°; 3 souches se développant faiblement à 14° (tableau I).

Propriétés biochimiques; carbohydrates: toutes les souches (5) acidifient le glucose, l'arabinose, le mannose, le galactose, la mannite, le sorbite et le tréhalose; en plus, 3 souches — le xylose, 4 souches — le maltose, 2 souches — le raffinose et 1 souche — le dulcitol; aucune souche n'acidifie le rhamnose, l'inosite et le lactose. *L'amidon, la gélatine et la caséine* ne sont pas hydrolisés; *la tyrosine* n'est pas utilisée. *Le citrate et le succinate de sodium* sont utilisés, mais pas le *benzoate de sodium*. Réduction des *nitrates* en nitrites. *Catalase-positives. Tolérance au NaCl:* 1 souche s'est développée en bouillon à NaCl 5%.

II. *Souches s'encadrant dans l'espèce smegmatis:*

Myc. smegmatis Rome 1951
Myc. smegmatis 99 Jena 1955
Myc. smegmatis 345 Jena 1955
Myc. smegmatis 365 Paris 1956
Myc. smegmatis 909 Paris 1957
Myc. smegmatis Paris 1957
Myc. smegmatis « S^1 » Rome 1958
Myc. smegmatis Washington Rome 1958
Myc. smegmatis SA7 var. Bucarest 1958
Myc. smegmatis SA8 var. Bucarest 1958
Myc. friburgensis Rome 1951
Myc. friburgensis Paris 1957
Myc. rabinowitchi Rome 1951
Myc. rabinowitchi Paris 1956
Myc. rabinowitchi Paris 1957
Myc. rabinowitchi Rome 1958
Myc. butyricum 99 Jena 1955
Myc. butyricum 133 Lausanne 1951
Myc. ranae Lausanne 1950
Myc. nayaoma Paris 1957
Myc. milk moelleri Paris 1957
Myc. moelleri 26 Lausanne 1950
Myc. milch Rome 1958
Myc. grassbergeri Lausanne 1950
Myc. 607 Rome 1958

Caractères physiologiques des mycobac

Réactions	*M. Phlei*					*M. Pellegrini*										
	M. crottin Rome 1951	M. crottin Paris 1956	M. phlei Paris 1956	M. phlei Paris 1957	M. phlei crottin Rome 1958	M. pellegrini Rome 1951	M. pellegrini Paris 1956	M. pellegrini Paris 1957	M. pellegrini Rome 1958	M. pellegrini 5	M. pellegrini 1471 1934	M. smegmatis Rome 1951	M. smegmatis 99 1955	M. smegmatis 345 1955	M. smegmatis 365 1956	M. smegmatis 909 1957
Décomposition de la caséine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	·	−	−	−
gélatine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Tyrosine	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Hydrolyse de l'amidon	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
Développement à 14°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±
37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52°	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−
Survie à: 60° 4 heures	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Acide: arabinose	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
dulcite	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
galactose	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
inosite	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
lactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
maltose	−	+	+	+	+	±	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+
mannose	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
raffinose	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
rhamnose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
sorbite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+
xylose	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	−
Utilisation de: benzoate	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

téries saprohytes étudiées *Tableau I*

	M. Smegmatis																			*M. Fortuitum*		
	M. smegmatis Paris 1957	M. smegmatis « S » Rome 1958	M. smegmatis W. Rome 1958	M. smegmatis SA_7	M. smegmatis SA_8 var. 1958	M. friburgensis Rome 1951	M. friburgensis Paris 1957	M. rabinowitschi Rome 1951	M. rabinowitschi Paris 1956	M. rabinowitschi Paris 1957	M. rabinowitschi Rome 1958	M. butyricum 99 1955	M. butyricum 133 1951	M. ranae Lausanne 1950	M. nayaoma ny 14 1957	M. milch moeller 1957	M. moeller 26 1950	M. milch Rome 1958	M. grassbergei 1950	M. 607	M. minetti Rome 1958	M. battaglini Rome 1958	M. thamnopheos Lausanne 1950
1	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
3	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
4	−	−	−	−	±	−	−	±	−	±	+	−	−	−	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−
5	±	±	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
6	+	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+
7	+	+	+	+	±	+	+	+	−	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	−
8	+	+	±	+	+	±	+	+	−	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
9	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
10	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
12	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−
13	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	−	−	−
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+
15	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
17	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	−	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	±	+	−	+	−	+
19	+	−	−	−	−	+	−	+	−	−	·	−	−	−	−	−	−	−	−	±	−	−	−	+
20	+	+	+	+	+	±	+	±	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
22	−	+	−	+	+	±	+	+	+	±	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
23	−	+	±	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	−	+	┌	+	+	+	+	+	−	−	−
24	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Les 25 souches qui ont été encadrées dans l'espèce *smegmatis* présentent les caractères suivants:

Morphologie: bacilles de forme et dimensions variées: longs et minces ou filamenteux, incurvés et granulaires, Gram-positifs, à l'exception de 4 souches qui sont un mélange de bacilles Gram-positifs et Gram-négatifs (*Myc. friburgensis* 1951, *Myc. rabinowitchi* 1951, Myc. *smegmatis* 345 et *Myc.* SA_7); acido-résistants (50—100%).

Cultures : Se développent sur agar, agar-glycérol et abondamment sur agar-extrait de terre-glycérol; sur bouillon-glycérol-voile. Microscopiquement: colonies ressemblant à celles des *Myc. phlei ;* macroscopiquement: pour la majorité des souches, sur agar-glycérol, après 48 heures d'incubation: cultures en nappe, fines, blanches, crêmeuses ou orange-pâle, devenant, après 2 semaines, abondantes, de forme « R », se pigmentant en orange (14 souches) ou restant crême (11 souches). *Température :* développement à 28°; 37°, 40° et 45°; la majorité se développent faiblement aussi à 14°; à 52° seulement 2 souches *(Myc. smegmatis* 565 et la variante SA_8); aucune des souches n'a survécu après 4 heures à 60° (tableau I).

Propriétés biochimiques : Carbohydrates fermentés : toutes les 25 souches: le rhamnose, l'arabinose, la mannite, le sorbite, l'inosite, le maltose, le tréhalose; en plus: 21 souches — le xylose — 24 souches — le mannose, 23 souches — le galactose et le dulcite, 6 souches — le raffinose. *L'amidon* est hydrolisé par 5 souches; la *gélatine* n'est pas hydrolisée; 3 souches ont partiellement hydrolysé *la caséine : la tyrosine* n'est pas décomposée. *Le succinate, le benzoate et le citrate de sodium* sont utilisés. Réduction des *nitrates* en *nitrites. Catalase*-positives. *Tolérance au NaCl :* En bouillon à NaCl 5% — 16 souches avec NaCl 7%—10 souches (développement faible).

III. *Souches encadrées dans l'espèce fortuitum :*

Myc. minetti (de Rome 1958), qui a présenté les caractères suivants:

Morphologie : bacilles très courts et minces, Gram-positifs et Gram-négatifs, acido-résistants et non-résistants.

Culture : se développe bien sur agar-glycérol et agar extrait de terre-glycérol, faiblement sur agar nutritif; microscopiquement: colonies bombées, ou bien rugueuses à marges irrégulières, blanches; aspect macroscopique sur agar-glycérol, après 2 jours d'incubation: culture fine, blanche, devenant après 2 semaines, abondante, crêmeuse. *Température :* se développe à 14°, 28°, 37° et 40°, mais non à 45°, 52° (tableau I).

Propriétés biochimiques : Carbohydrates fermentés : mannose, dulcite, maltose et tréhalose; n'acidifie pas: le glucose, rhamnose, xylose, arabinose, galactose, mannite, sorbite, inosite, dulcite, lactose. *L'amidon, la caséine* et *la gélatine* ne sont pas hydrolysés; *la tyrosine* n'est pas décomposée; le *succinate* et le *citrate de sodium* sont utilisés, mais non le *benzoate de sodium.* Réduction des *nitrates* en *nitrites. Catalase*-positive. *Tolérance au NaCl :* se développe en bouillon NaCl 5% et 7%.

IV. *Souches ne s'encadrant pas dans le schéma de Gordon-Smith* (1953, 1955) étiquettées « *pellegrini* » *:*

Myc. pellegrini Rome 1951
Myc. pellegrini Paris 1956
Myc. pellegrini Paris 1957
Myc. pellegrini Rome 1958
Myc. pellegrini 5
Myc. 1471 Londres 1932

Les 6 souches de ce groupe, présentent les caractères suivants:

Morphologie : bacilles de formes et dimensions variées, allant de la forme coccoïde jusqu'aux formes très allongées; 4 souches présentent des ramifications; Gram-positifs; acido-résistants (5—10%).

Cultures : se développent bien sur agar, agar-glycérol et agar-extrait de terre-glycérol, formant, après 2 jours d'incubation, une culture abondante, de couleur rouge. Sur bouillon-glycérol: voile, qui se pigmente en rouge. Aspect microscopique: colonies grandes et petites, plates, rugueuses, à marges irrégulières ou colonies bombées, rugueuses, à marges irrégulières. *Température :* se développent à 14°, 29°, 37°, 40° et 45°; deux souches aussi à 52° *(Myc. pellegrini* Rome 1958 et *Myc.* 1471 Londres*)* non-résistantes à 60° après 4 heures d'incubation (tableau I).

Propriétés biochimiques : Carbohydrates acidifiés par toutes les 6 souches: mannose, mannite, sorbite, maltose, tréhalose, 1 seule aussi le raffinose; aucune ne fermente le rhamnose, arabinose, galactose, inosite, dulcite et lactose. *L'amidon, la gélatine et la caséine*, ne sont pas hydrolysés; *la tyrosine est décomposée. Le citrate, le succinate et le benzoate de sodium* sont utilisés, réduction des *nitrates*, en *nitrites* (tableau I). *Catalaso*-positives. *Tolérance au NaCl :* 4 souches se développent en bouillon + NaCl 5% et une en bouillon NaCl 7%.

V. *Souches qu'on n'a pu encadrer dans aucune espèce :*

1. *Myc. battaglini*, Rome 1958, avec les suivants caractères:

Morphologie : bacilles longs et minces, Gram-positifs, acido-résistants.

Cultures : se développe difficilement sur les milieux de culture, plus abondantes sur agar-glycérol, agar-extrait de terre-glycérol et développement faible sur agar-nutritif. Colonies très denses, petites, fines, rugueuses, pigment jaune-orange. Sur bouillon-glycérol: voile. *Température :* se développe à 37°, 40° et 45°, mais pas à 14°, 52° et 60°.

Propriétés biochimiques : acidifie le glucose et le mannose, mais pas le mannite, rhamnose, sorbite, dulcite, inosite, raffinose, lactose, maltose et tréhalose. Hydrolyse *l'amidon, la gélatine et la caséine ;* ne décompose pas la tyrosine. Utilise *le succinate* de sodium, mais pas le *citrate* et le *benzoate de sodium ;* réduction des *nitrates en nitrites. Catalase*-positive. *Tolérance au NaCl :* développement faible sur milieu avec NaCl 5% et 7%.

2. *Myc. Thamnopheos* 62, Lausanne 1950, présente les suivants caractères:

Morphologie : Bacilles courts et minces, Gram-positifs, acido-résistants.

Cultures. Se développe bien sur milieux avec extrait de terre-glycérol et très faiblement sur agar nutritif. Sur bouillon-glycérol: voile abondant plissé. Colonies fortement bombées, à surface irrégulière, se pigmentant en blanc-jaunâtre après 48 heures, gardant pendant longtemps cette nuance. *Température :* Développement abondant à la température de la chambre et à 37° ; ne se développe pas à 40°, 45°, 52° et 60°.

Propriétés biochimiques : Carbohydrates : Acidifie le glucose, mannose, mannite, inosite, raffinose, tréhalose et le maltose, mais pas le rhamnose, xylose, arabinose, galactose, sorbite, dulcite et le lactose. *L'amidon, la caséine et la gélatine* ne sont pas hydrolysés; n'utilise pas la *tyrosine*, *catalase*-positive. *Tolérance à NaCl* — absente.

Sensibilité aux antibiotiques. Les souches de *Mycobactéries saprophytes* ont été étudiées toutes, du point de vue de leur sensibilité aux antibiotiques (tableau II).

Tableau II

Sensibilité aux antibiotiques de 39 souches de *Mycobactéries saprophytes*

Souches	PAS			Streptomycine			HIN			
	10γ/ml	100γ/ml	500γ/ml	10γ/ml	20γ/ml	100γ/ml	1γ/ml	5γ/ml	10γ/ml	100γ/ml
Sensibles	0	0	0	36	36	38	2	8	13	27
Résistantes	39	39	39	3	3	1	37	31	26	12
Résistantes%	100	100	100	7,7	7,7	2,5	90,0	77,1	66,7	30,7

Du tableau II, il ressort que 38 des souches étudiées sont sensibles à la streptomycine, une seule (*Battaglini*) étant résistante même à 100 gamma/ml; deux autres souches *(Myc. thamnopheos et M. minetti)* sont résistantes à 10 et 20 gamma/ml, étant sensibles à 100 gamma/ml streptomycine.

Les 39 souches sont résistantes au PAS; la majorité des souches sont résistantes à 1,5 et 10 gamma/ml HIN, 27 souches sont sensibles à 100 gamma/ml HIN.

En résumé, les souches de *Mycobactéries* étudiées sont: sensibles à la streptomycine, résistantes au PAS et pour la plupart aussi à l'HIN.

La souche *M. battaglini* a été résistante aux 3 antibiotiques.

Par conséquent le test de la sensibilité aux antibiotiques ne représente pas un critérium pour la différenciation des *Mycobactéries saprophytes.*

B. Treize souches de *Mycobactéries atypiques* (61, 73, 74, 83, 82, 94, 100, 101, 103, 104, 35A, 12A) isolées des malades en 1958—1959, ont été examinées du même point de vue que les *Mycobactéries saprophytes* précités.

Résultats : Les souches de *Mycobactéries atypiques* ont présenté les caractères suivants:

Morphologie : Bacilles variant de forme et dimension: formes courtes ou longues, granulaires ou non-granulaires, Gram-positifs, acidorésistants (100%).

Cultures : le développement sur agar-nutritif est lent (7—14 jours), plus rapide et plus abondant sur agar-glycérol et milieu de Loewenstein (2—7 jours). Le développement sur bouillon-glycérol est faible, à l'exception de 2 souches (73 et 39) qui forment un voile caractéristique. A l'examen microscopique on constate plusieurs formes de colonies: à aspect spongieux, irrégulières, ou bien petites, lisses, à contour irrégulier, ainsi que des colonies filamenteuses. La majorité des souches (11) présente sur agar-glycérol et milieu Loewenstein des cultures « S » en forme de nappe fine, jaune-orange ou blanche (2 souches: 35A et 12A).

Température : 8 souches se développent faiblement à 14°; à 40° et 45° une seule *:* la souche 73; à 52° et à 60° aucune souche .

Propriétés biochimiques : Carbohydrates : Sur 13 souches, 9 ne fermentent aucun des carbohydrates utilisés, les autres acidifient 1 à 5 substances. Ainsi, la souche 74 acidifie: le glucose, mannose, raffinose, maltose, tréhalose; la souche 35A — le xylose; la souche 100 — le glucose et la souche 61, le glucose et le tréhalose. Une seule souche (39) hydrolyse *l'amidon. La gélatine et la caséine* ne sont pas hydrolysées et la *tyrosine* n'est pas décomposée. *Le citrate, le succinate*

et le benzoate de sodium ne sont pas utilisés. La majorité de souches (12 souches) réduisent les *nitrates* en *nitrites;* toutes sont *catalase*-positives. *Tolérance au ClNa :* faible développement en bouillon + NaCl 5% de 11 souches et + NaCl 7% de 6 souches.

Tableau III

Caractères physiologiques des M. Atypiques étudiées

Réactions	*M. ATYPIQUES*												
	73	74	61	82	83	94	100	103	101	104	39	12A	35A
Décomposition de la:													
galactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
caséine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
tyrosine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Hydrolyse de l'amidon	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	−	−
Développement à: 14°	+	+	+	−	−	±	−	−	−	+	+	+	+
37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
45°	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
52°	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Survie à: 60° 4 heures	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Acide d'arabinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
dulcite	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
galactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
glucose	−	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
inosite	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
lactose	−	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−
maltose	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
mannite	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
mannose	−	±	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
raffinose	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
rhamnose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
sorbite	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
tréhalose	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
xylose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Utilisation du benzoate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
citrate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
succinate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Réduction des nitrates	+	±	+	+	±	+	±	+	±	±	+	+	−
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La sensibilité aux antibiotiques des souches de *Mycobactéries atypiques* est consignée dans le tableau IV.

L'examen du tableau IV montre que la moitié des souches sont sensibles au PAS, la grande majorité (à l'exception de la souche 73) à la streptomycine et plus de la moitié à l'HIN. Douze souches sur 13 (12/13) sont résistantes à la terramycine et chloromycétine. Toutes les souches sont TB_1 -résistantes. En ce

qui concerne la provenance des souches, on n'a pu observer de différences du point de vue de la chimio-résistance entre les bacilles isolés des malades traités et non-traités aux antibiotiques. Toutefois, deux souches (74 et 104) isolées du même malade, à un an d'intervalle se sont comportées différemment du point de vue des réactions biochimiques (v. tableau II), sans présenter néanmoins de différences en ce qui concerne la résistance initiale à l'HIN et au PAS.

Tableau IV

Sensibilité aux antibiotiques de 13 souches de *Mycobactéries atypiques*

Souches	PAS			Streptomycine			HIN				Terramycine			Chloromyc.			TB_1		
	10 γ/ml	100 γ/ml	500 γ/ml	10 γ/ml	20 γ/ml	100 γ/ml	1 γ/ml	10 γ/ml	10 γ/ml	100 γ/ml	1 γ/ml	5 γ/ml	10 γ/ml	1 γ/ml	5 γ/ml	10 γ/ml	0,5 γ/ml	1 γ/ml	5 γ/ml
Sensibles	5	6	7	12	12	12	6	9	9	12	2	2	2	1	1	1	0	0	0
Résistantes	8	7	6	1	1	1	7	4	4	1	11	11	11	12	12	12	13	13	13
Résistantes %	61	53	46	7	7	7	53	30	30	15	84	84	84	92	92	92	100	100	100

C. Parallèlement aux souches de *Mycobactéries saprophytes et atypiques*, on a étudié la sensibilité aux mêmes antibiotiques (PAS, streptomycine et HIN) de 7 souches de *Myc. avium* (une souche de collection « *Griffith* » et 6 souches isolées entre 1957—1959 au laboratoire de recherches bactériologiques de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest: *(1154, 1486, Médecine, Moşneni, Ipia, Pallas)*, ainsi que des *Mycobactéries « type » : $H_{37}Rv$, $H_{37}Ra$* et *Ratti.*

La sensibilité des 7 souches de *Myc. avium* est consignée dans le tableau V qui montre que toutes les souches de *Myc. avium* sont sensibles à la streptomycine (20 et 100 gamma/ml), la majorité étant sensible au PAS (100 et 500 gamma/ml), à l'exception de deux, *Griffith* et *Pallas*, qui sont totalement insensibles. Toutes les souches sont résistantes à 1 et 5 gamma/ml de HIN; 2 souches (*Ipia* et *Griffith*) sont résistantes à 100 gamma/ml HIN, les autres 5 souches étant sensibles à cette dose.

Les souches *H_{37} Ra*, *H_{37} Rv* et *Ratti* ont été sensibles aux 3 antibiotiques utilisés.

En conclusion, on constate que les souches de *Myc. avium* se comportent différemment des souches de *Myc. saprophytes*, des *Myc. atypiques* et de *Mycobactéries type tbc*, dans le sens que toutes les souches de *Myc. avium* sont sensibles à la streptomycine, la majorité au PAS, résistantes au HIN en petites doses et la plupart sensibles à 100 gamma/ml HIN. Soulignons que la souche de laboratoire M. *avium Griffith* se comporte du point de vue sensibilité aux antibiotiques comme une *Mycobactérie saprophyte.*

Tableau V

Sensibilité aux antibiotiques de 7 souches de *Myc. avium*

Souches	PAS			Streptomycine			HIN			
	10γ/ml	100γ/ml	500γ/ml	10γ/ml	20γ/ml	100γ/ml	1γ/ml	5γ/ml	10γ/ml	100γ/ml
Sensibles	2	5	5	3	7	7	0	0	2	5
Résistantes	5	2	2	4	0	0	7	7	5	2

DISCUSSION

L'étude comparative de 39 souches de *Mycobactéries saprophytes* a montré que 79,6% s'encadrent dans les espèces décrites par GORDON et SMITH (1953—1955) comme suit: 5 souches (12,8%) dans l'espèce *Myc. phlei*, 25 (64%) dans l'espèce *Myc. smegmatis*, 1 souche (2,8%) dans l'espèce *Myc. fortuitum*. Six souches (15,3%), présentant des caractères particuliers, forment un groupe à part «*Pellegrini*» qui se caractérise par: développement sur milieux usuels à 14°, 37°, 40° et 45°, pigment rouge, tendance à la ramification, acido-résistance discrète, acidifiant le sorbite, mais non le dulcite et l'arabinose; utilisation du citrate, du succinate et du benzoate de sodium, décomposition de la tyrosine, etc.); les caractères décrits plus haut rapprochent le groupe «*Pellegrini*» de l'espèce *rhodochrous* (GORDON 1959) (18)*.

Deux autres souches de *Mycobactéries* (5,10%), *Myc. thamnopheos*—pathogène pour le serpent — et *Myc. battaglini*-pathogène pour le lapin — selon *Penso* (1948) n'ont pu être encadrées dans aucune des espèces mentionnées, chacune d'entre elles présentant 3—4 caractères en plus ou moins par rapport au schéma convenu.

L'étude comparative des réactions physiologiques des *Mycobactéries saprophytes* étudiées est donnée dans le Tableau VI.

Les recherches sur la sensibilité aux antibiotiques (PAS, streptomycine et HIN) ont prouvé une fois de plus que ce test ne permet pas une différenciation nette entre les diverses espèces de *Mycobactéries saprophytes*. Ainsi, toutes les souches saprophytes, à l'exception d'une seule, *Myc. battaglini*, sont sensibles à la streptomycine, 80% sont résistantes à 1—10 gamma/ml H.N et résistantes aux PAS (100%).

L'étude des *Mycobactéries atypiques* montre que ces souches ressemblent du point de vue tinctorial, morphologique et structurel aux *Mycobactéries saprophytes :* elles se comportent toutefois, différemment du point de vue des caractères biochimiques, de la capacité de se développer à différentes températures, ainsi que de celui de la sensibilité aux antibiotiques. Ainsi, toutes les souches sont 100% acido-résistantes, se développent difficilement sur agar-nutritif et mieux sur agar-glycérol et milieu de Loewenstein, donnent fréquemment des cultures «S», pigmentées en jaune-orange (11 souches) et non-pigmentées (2 souches). A l'exception d'une souche, elles ne se développent pas à 40° et 45° et aucune ne résiste pendant 4 heures à 60°. Toutes les souches manifestent une activité fermentative réduite (9 d'entre elles n'acidifient aucun carbohydrate); elles n'utilisent pas le succinate, le citrate et le benzoate de sodium, n'hydrolysent pas l'amidon, la caséine et la gélatine et ne décomposent pas la tyrosine.

En tenant compte des caractères culturels et de pigmentation, 11 de ces souches (73, 74, 61, 82, 83, 94, 100, 101, 103, 104 et 39) sont considérées comme scotochromogènes — groupe II, tandis que les deux autres (35A et 12A, non-pigmentées, reviennent au groupe III, non-photochromogène (RUNYON) (11).

La sensibilité aux antibiotiques des Mycobactéries atypiques diffère de celle des *saprophytes :* la moitié des souches sont sensibles au PAS, à l'excep-

*) Ces recherches étaient achevées lorsque nous avons appris l'existence de la nouvelle espèce décrite par Gordon et Mihm en 1959(18) *Myc. rhodochrous*, caractérisée par: acido-résistance faible, pigment rouge, développement à 10°C, acidification du sorbite, incapacité de fermenter la dulcite, l'arabinose et l'erythrol, utilisaton du mucate, de l'oxalate et du benzoate de sodium, décomposition de la tyrosine.

tion d'une seule, elles sont toutes sensibles à la streptomycine et plus de la moitié au HIN. Elles sont résistantes à la terramycine et à la chloromycétine (à l'exception de deux souches) et résistantes au TB_1.

Tableau VI

Tableau comparatif des réactions physiologiques des *Mycobactéries saprophytes* étudiées

Réactions	5 souches de *M. phlei* souches positives %	25 souches de *M. smegmatis* souches positives %	1 souche de *M. fortuitum* souches positives %	6 souches de *M. pellegrini* souches positives %	1 souche de *M. thamnopheos*	1 souche de *M. battaglini*
Décomposition de la gélatine	0	0	0	0	0	0
de la caséine	0	0	0	0	0	0
de la tyrosine	0	0	0	100	0	0
Hydrolyse de l'amidon . .	0	20	0	0	0	0
Développement à 52° . .	100	8	0	8		
45° . .	100	100	0	100	0	+
40° . .	100	100	+	100	0	+
37° . .	100	100	+	100	+	+
14° . .	100	100	+	100	+	0
Survie à 60° pendant 4 heures	100	0	0	0	0	0
Acidification de						
arabinose	100	100	0	0	0	0
dulcite	20	96	+	0	0	0
galactose	100	100	0	0	0	0
glucose	100	100	0	100	+	+
inosite	0	100	0	0	+	0
lactose	0	0	0	0	0	0
mannitol	100	100	0	100	+	0
mannose	100	96	+	100	+	+
raffinose	40	20	0	16,6	0	0
rhamnose	0	100	0	9	0	0
sorbite	100	100	0	100	0	0
tréhalose	100	100	+	100	+	0
xylose	60	84	0	50	0	0
Utilisation de:						
benzoate .	0	100	0	100	0	0
citrate . .	100	100	+	100	+	0
succinate .	100	100	+	100	+	+
Réduction des nitrates . .	100	100	+	100	+	+
Catalase	100	100	+	100	+	+

En ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Myc. avium*, leur comportement est différent de celui des *Mycobactéries saprophytes*, *atypiques* et *typiques* (H_{37} R*a*, H_{37} R*v* et R*atti*), ces dernières étant sensibles aux trois antibiotiques utilisés. Toutes les souches de *Myc. avium* étudiées sont sensibles à la streptomycine, la majorité aussi au PAS; elles sont résistantes à l'H_4N en petites concentrations et sensibles — pour la plupart — à 100 gamma/ml HIN.

Soulignons qu'il y a un parallélisme évident entre le groupement des *Mycobactéries saprophytes* à l'aide des tests morphologiques et biochimiques et celui

réalisé par le typage des mycobactériophages (communication présentée au IV-me coloquium de lysotypie, Wernigerode 1960).

Le problème bien plus complexe de la situation taxonomique des *Mycobactéries atypiques* ne saurait être résolu à l'aide du schéma présenté dans cette note.

CONCLUSIONS

L'étude comparative des souches de *Mycobactéries saprophytes, atypiques* et *typiques*, permet de tirer les conclusions suivantes:

1. De 39 souches de *Mycobactéries saprophytes* étudiées: 79,6% ont pu être encadrées dans le schéma de GORDON-SMITH (1953—1955); 15,3% ont formé un groupe à part, dénommé « *Pellegrini* », se rapprochant de l'espèce *rhodochrous*, décrite par GORDON-MIHM en 1959 et 5,10% n'ont pu être encadrées dans aucune des espèces citées.

2. Les *Mycobactéries atypiques* étudiées ressemblent du point de vue morphologique et culturel aux *Mycobactéries saprophytes* mais diffèrent du point de vue biochimique, par leur comportement à différentes températures et sensibilité aux antibiotiques, ne pouvant être encadrées dans les espèces décrites par GORDON et SMITH.

3. Les recherches concernant la sensibilité aux antibiotiques (PAS, streptomycine, HIN) ont prouvé que ce test ne permet pas la différenciation des espèces de *Mycobactéries*.

4. Les *Mycobactéries atypiques* et *aviaires* se distinguent des *Mycobactéries saprophytes*, aussi par leur sensibilité aux antibiotiques antituberculeux (PAS, streptomycine et HIN).

BIBLIOGRAPHIE

1. THOMSON H. M. — Am. Rev. Tuberc. 1932, **26,** 162.
2. GORDON R. E. — J. of Bact. 1937, **34,** 617.
3. GORDON R. E. et HAGAN W. A. — J. of Bact. 1938, **36,** 39.
4. HAUDUROY P., CHARIE E., FLOREY H., JENSEN, K. et PENSO G. — Bacilles tuberculeux et paratuberculeux 1950, Masson.
5. GORDON R. E. et SMITH M. — J. of Bact. 1953, **66,** 41.
6. GORDON R. E. et SMITH M. — J. of Bact., 1955, **69,** 303.
7. ROMAN I., GAIGINSCHI A. et collab. — Studii şi Cercet. St. Medicina 1957, **8,** 149.
8. NASTA M. et BOGDANESCO V. — Bull. de l'Union Internationale contre la Tuberculose 1959, 379.
9. BOGDANESCO V. — Ftiziologia 1959, **3,** 193.
10. KAGRAMANOV A. I. — Bull. de l'union internationale contre la tuberculose 1959, **3,** 225.
11. RUNYON PH. D. — Bull. de l'union internationale contre la tuberculose 1959, **3** 379.
12. KELLERMAN K. K. et MCBETH I. G. — Zentr. Bakt. Parasitenk. 1912, **34,** 485.
13. AYERS S. H., RUPP R. et JOHNSON W. T. — U.S. Dept. Agr. Bull. 1919, 782.
14. FRAZIER W. C. — J. Inf. Diseases 1926, **39,** 302.
15. HASTINGS E. G. — Cblt. Bakt. Parasitenk. 1903, **10,** 384.
16. KOSER S. A. — J. of Bact. 1924, **2,** 59.
17. CONN H. J. — Biotech. Pub. Geneva, N. Y. Leaflet 5, 12th, ed. 1951, 10.
18. GORDON R. E. et MIHM J. — J. Gen. Microbiologie 1959, **21,** 735.

Nous remercions Mrs les Professeurs M. Nasta et N. Stamatin ainsi que le Dr. V Bogdânesco pour les souches de Myc. atypiques et aviaires, qu'ils ont eu l'amabilité de nous envoyer.

К ИЗУЧЕНИЮ ШТАММОВ САПРОФИТНЫХ И АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

I / ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучались сравнительно 39 штаммов сапрофитных микробактерий (из Музея Инст. Кантакузино) и 13 штаммов атипичных микобактерий (Инст. Фтизиологии — Бухарест) с точки зрения морфологических, культуральных и биохимических свойства, по схеме Гордона и Смита (1953—1955). Испытывалась также чувствительность к антибистикам выше упомянутых штаммов микобактерий, так же как и 7 штаммов *Myc. avium* и 3 типовых музейных штаммов микобактерий.

На основании данных исследований, 79,5% изученных сапрофитных микобактерий были отнесены к видам, установленным Гордоном и Смитом в 1953—1955: 5 штаммов (12,8%) к виду *Myc phlei* 25 штаммов (64%) к виду *Myc fortuitum*, один штамм (2,8%) к виду *Myc. smegmátis* 6 штаммов (15,3%) со свойствами, отличающимися от упомянутых штаммов, входят в особую группу Пеллегрини, характеристика которой следующая: рост на общепринятых средах при 14°, 40°, 45°, красный пигмент, полиморфные палочки с тенденцией к ветвлению, слабая кислоустойчивость, ферментирование сорбита, отсутствие ферментирования дульцита и арабиноза; потребление цитрата, сукцината и *бензоата;* разложение тирозина, и т.д., — свойства, приближающие группу Пеллегрина к виду rhodocrous (Gordon 1959).

Два других штамма микобактерий (5,10%) *Myc thamnopheus* — патогенный для змеи — и *Myc Battaglini* — патогенный для кролика, — не входят по Пенсо ни в какой из упомянутых видов.

Штаммы атипичных микобактерий, сходные с точки зрения морфологии и культуральных свойств с сапрофитными микобактериями, ведут себя различно с точки зрения биохимии, развития при разных температурах и чувствительности к антибиотикам. Все атипичные штаммы кислото-устойчивы в 100% случаев, с трудом развиваются на питательном агаре, развиваясь легче на глицериновом агаре и на среде Левенштейна, причем большинство культур гладкие, с желто — оранжевым пигментом (11/13), или без пигмента — (2/13). Штаммы не развиваются при 40° и 45° (с исключением одного штамма) и ни один не выживает при 60°) в течении 4 часов). Все штаммы проявляют *ферментативные свойства* (9 штаммов не сбраживают никаких углеводов); *не потребляют сукцинат бензоата натрия;* не гидролизируют крахмал, казеин, желатин и не разлагают тирозин.

Из проведенных исследований следует, что атипичные микобактерии, изученные нами, не могут быть отнесены к видам, предложенным Гордон.

Исследования, касающиеся чувствительности к антибиотикам (ПАСК, стрептомицин, ИНГ), не установили возможность дифференциации разных видов микобактерий при помощи данного теста.

Что касается чувствительности к антибиотикам штаммов атипичных микробактерий и *Myc avium*, то она отличается от чувствительности сапрофитных микобактерий и типичных патогенных микобактерий.

Между разделением сапрофитных микобактерий при помощи биохимических, морфологических и культуральных тестов и разделением по чувствительности к бактериофагу, существует известный параллелизм.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM SAPROPHYTISCHER UND ATYPISCHER MYKOBAKTERIENSTÄMME

I. UNTERSUCHUNG DER MORPHOLOGISCHEN, BIOCHEMISCHEN UND KULTURMERKMALE UND DER EMPFINDLICHKEIT AUF ANTIBIOTIKA

ZUSAMMENFASSUNG

Neununddreissig saprophytische Mykobakterienstämme aus der Sammlung des Cantacuzino-Instituts und 13 atypische Mykobakterienstämme vom Institut für Phthisiologie in Bukarest wurden auf ihre morphologischen, biochemischen und Kultureigenschaften, nach dem Schema von GORDON und SMITH (1953—1955) untersucht. Ausserdem wurde die Empfindlichkeit auf Antibiotika bei den angeführten Mykobaterienstämmen, sowie bei 7 Stämmen

von *Myco. avium*, und bei 3 typischen Stämmen von *Myco. tuberculosis var. hominis* (Sammlung) geprüft.

Auf Grund dieser Untersuchungen konnten 79,5% der saprophytischen Mykobakterienstämme in die von GORDON und SMITH (1953—1955) aufgestellten Arten wie folgt eingeordnet werden: 5 Stämme (12, 8%) in die Art *Myco. phlei*, 25 Stämme (64%) in die Art *Myco. smegmatis*, 1 Stamm (2,8%) in die Art *Myco. fortuitum*, 6 Stämme (15.3%) mit von den genannten Arten abweichenden Eigenschaften *in eine besondere Gruppe (Pellegrini)*. Die Stämme dieser Gruppe sind durch Wachstum auf den üblichen Nährböden bei 1+°C, 40°C und 45°C, Bildung von rotem Pigment, Pleomorphismus mit Neigung zur Verzweigung und durch schwache Säurefestigkeit gekennzeichnet. Sie vergären Sorbit, Dulzit und Arabinose nicht, sind jedoch imstande die Salze der Zitronen, Bernstein- und der Benzoesäure zu verwerten und Tyrosin aufzuspalten, etc. Diese Eigenschaften bringen die Gruppe *Pellegrini* der Art Rhodochrous (GORDON, 1955) nahe.

Zwei andere Stämme von Mykobakterien (5,10%), *Myco. thamnopheos* (pathogen für Schlangen) und *Myco. Battaglini* (pathogen beim Kaninchen nach PENSO), lassen sich in keine der aufgezählten Arten einordnen.

Die atypischen Mykobakterienstämme, die morphologisch und kulturell den saprophytischen Mykobakterien ähnlich sind, unterscheiden sich von ihnen vom biochemischen Standpunkt und durch das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen, sowie durch die Empfindlichkeit auf Antibiotika. Alle atypischen Stämme sind 100% säurefest, entwickeln sich schwer auf Nähragar und besser auf Glyzerinagar und auf Löwensteins Nährboden und weisen meistens S-Kulturen auf; 11 der 13 Stämme bildeten ein orange-gelbes Pigment, während die übrigen 2 nicht pigmentiert waren. Mit Ausnahme eines einzigen Stammes, entwickeln sie sich nicht bei 40° und 45°C und keiner der Stämme widerstand einer 4 Stunden langen Erwärmung auf 60°C. Alle Stämme wiesen eine schwache Vergärungstätigkeit auf (9 Stämme vergärten keinen einzigen Zucker) und keiner war imstande die Natriumsalze der Zitronen-, Bernstein-und der Benzoesäure zu verwerten, Stärke, Casein oder Gelatin zu hydrolysieren oder Tyrosin aufzuspalten.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass die von uns untersuchten atypischen Mykobakterien nicht in die von GORDON vorgeschlagenen Arten eingeordnet werden können.

Die Untersuchungen der Empfindlichkeit auf Antibiotika (PAS, Streptomyzin, INH) ergaben, dass es auf diesem Wege nicht möglich ist die verschiedenen Mykobakterienarten zu unterscheiden.

Was die Empfindlichkeit der atypischen Mykobakterienstämme und von *Myco. avium* auf Antibiotika betrifft, unterscheidet sie sich sowohl von der saprophytischer Mykobakterien als auch von der typischer pathogener Mykobakterien.

Zwischen der Einteilung der saprophytischen Mykobakterien auf Grund biochemischer Proben und ihres morphologischen und kulturellen Verhaltens einerseits, und der Empfindlichkeit auf Bakteriophagen andererseits, lässt sich ein gewisser Parallelismus feststellen.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF SAPROPHYTIC AND ATYPICAL MYCOBACTERIUM STRAINS

I. A STUDY OF THE MORPHOLOGICAL, CULTURAL, AND BIOCHEMICAL CHARACTERS AND OF THE SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS

SUMMARY

According to the pattern of GORDON and SMITH (1953—1955) 39 strains of saprophytic mycobacteria (collection of the Dr. I. Cantacuzino Institute) and of 13 strains of atypical mycobacteria (Institute of Phthisiology, Bucharest) have been comparatively studied as regards their morphological, cultural, and biochemical characters. The sensitivity to antibiotics was also investigated in these strains of mycobacteria as well as in 7 strains of *Myco. avium* and in 3 strains of *Myco-tuberculosis*, human type (collection).

The investigations showed 79.5 per cent of the saprophytic mycobacterium strains investigated to belong to the species established by GORDON and SMITH in 1953 and 1955, as follows: 5 strains (12,8 per cent) to the species *Myco. phlei*, 25 strains (64 per cent) to the species *Myco. smegmatis*, one strain (2.8 per cent) to the species *Myco. fortuitum*, and 6 strains (15.3 per cent) displaying characters which differed from those of the foregoing species and might be included in a separate group, i.e. the *Pellegrini* group. Strains belonging to this

group are characterized by growth on common media at 14°, 40°, 45°C, red pigment formation, pleomorphism with a tendency to branching, and slight acid-fastness. They do not ferment sorbitol, dulcitol, and arabinose, and are able to utilize citrate, succinate, and *benzoate* and to split *tyrosine*, etc. These characters render the *Pellegrini* group somewhat similar to the species *Rhodochrous* (GORDON, 1959).

Another 2 strains of mycobacteria (5.10 per cent), i.e. *Myco. thamnopheos* (pathogenic in snakes) and *Myco. battaglini* (pathogenic in the rabbit, according to PENSO) could not be included in any of the above mentioned species).

The atypical strains mycobacteria which resemble saprophytic mycobacteria from the morphological and cultural viewpoint, behave differently from the biochemical standpoint as well as in regard to their growth at various temperatures and their sensitivity to antibiotics. All the typical strains were 100 per cent acid fast, grew very poorly on nutrient agar, and better on glycerol agar and on Löwenstein's medium. Most of the cultures were of the smooth type; 11 of the 13 strains formed an orange-yellowish pigment while 2 did not. They did not develop at 40° and 45°C (with the exception of one strain) and none of them resisted heating at 60°C for 4 hours. All strains displayed low enzymatic activity (nine strains did not ferment any sugar) and were unable to utilize sodium, succinate, citrate, or benzoate, to hydrolyse starch, caseine, and gelatin, and to split tyrosine.

It is obvious from this investigation that the atipical mycobacteria studied by us cannot be included in any of the species established by GORDON.

Investigations concerning the sensitivity to antibiotics (PAS, streptomycin, INH) showed this test to be inadequate for the segregation of the various species of mycobacteria.

As regards the sensitivity to antibiotics of atypical strains of mycobacteria and of *Myc. avium*, it differs from the sensitivity of saprophytic mycobacteria as well as from that of typical pathogenic mycobacteria.

There is a parallelism between the pattern of classification of saprophytic mycobacteria according to biochemical, morphological, and cultural tests, and their division according to phage sensitivity.

QUELQUES DONNÉES EXPÉRIMENTALES SUR LE MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ ANTI-GANGRÉNEUSE

par

J. Bittner et Viorica Voinesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies)

— Manuscrit reçu le 9 mars 1960 —

Les difficultés rencontrées dans le contrôle de l'immunité expérimentale ou naturelle de la gangrène gazeuse expliquent la raison pour laquelle les conditions de l'immunisation contre cette infection sont encore peu connues. Ainsi, on ne connaît à peu près aucune espèce animale—l'homme compris — qui puisse présenter une immunité naturelle contre la gangrène gazeuse. La présence des agents pathogènes de cette maladie en nombre restreint ou en état de multiplication dans différentes plaies, avec phénomènes cliniques minimes ou absents (1), doit s'expliquer par l'existence de certains facteurs, qui empêchent la toxigénèse ou la pénétration de la toxine dans l'organisme.

En ce qui concerne l'immunité acquise par voie naturelle, il est très difficile de surprendre une récidive de cette maladie chez le même individu.

Quant à l'immunité active acquise artificiellement, c'est à peine ces dernières années que des méthodes efficientes d'immunisation expérimentale ont été élaborées; toutefois, les travaux réalisés dans ce domaine (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) ont poursuivi plutôt l'aspect pratique — l'acquisition de l'immunité — s'occupant moins de l'aspect théorique — la nature et les mécanismes de l'immunité. Cette situation est consignée aussi dans la décision de la Commission pour la gangrène gazeuse de la récente conférence d'Opatija (13), qui recommande pour l'avenir des études immunologiques générales, ainsi que l'approfondissement du problème de la pathogénèse de la gangrène gazeuse.

L'immunité passive, réalisée par l'administration prophylactique ou thérapeutique des sérums antigangréneux, bien que connue dès la première guerre mondiale (14), se développe néanmoins dans les conditions d'une affection à évolution généralement foudroyante, où souvent le sérum n'a pas la possibilité de pénétrer dans le foyer infectieux (15) et ne constitue guère un problème mieux élucidé que celui de l'immunité active.

L'aspect le mieux connu dans le problème général de l'immunité antigangréneuse, est celui de la *nature* de cette dernière. Les travaux, réalisés plus en détail sur le modèle expérimental du *Cl. perfringens*, ont prouvé catégoriquement que l'immunité est de nature antitoxique, plus encore, que l'organisme animal peut être défendu seulement par la présence de l'antitoxine contre une seule des componentes toxiques du *Cl. perfringens* de type A: l'alpha-toxine

(16, 17, 18, 19). Il a été prouvé que dans le cas de l'infection expérimentale avec le *vibrion septique*, l'immunité est également de nature antitoxique (20).

En ce qui concerne les *mécanismes* de l'immunité antigangréneuse, nous ne pensons pas exagérer en affirmant qu'ils sont en grande mesure inconnus.

Ceci s'explique peut-être aussi du fait que la pathogénie de la gangrène gazeuse n'est que vaguement précisée; de plus, dans ce problème existent plusieurs théories, parfois contradictoires (21, 22, 23, 24). Nous n'insisterons pas sur les détails de cette vaste discussion, dont les données ont été récemment systématisées, (24) que dans la mesure où le présent matériel le nécessitera.

★

Dans le cadre de nos recherches sur l'immunisation active expérimentale, nous avons eu la possibilité de poursuivre les résultats de l'entrée en jeu des mécanismes d'une immunité antigangréneuse solide, dans le cas d'une infection expérimentale, réalisée dans des conditions proches de l'infection naturelle et notamment, par l'injection d'une suspension de spores produisant en même temps un foyer de nécrose musculaire. V. Babeș, étudiant les effets de la sérothérapie antitétanique, (25) montre qu'il est indiqué d'éprouver la résistance de l'animal, immunisé passivement, vis-à-vis des spores et non vis-à-vis de la toxine ou culture que l'organisme ne rencontre jamais dans la nature. Bull et Pritchett (26) ont montré que l'effet pathogène de l'injection des cultures totales de *Cl. perfringens* est dû en grande mesure à la toxine préformée dans cette culture. Robertson (27), ainsi que d'autres auteurs, soutiennent que dans la nature la contamination des animaux ou de l'homme avec les agents pathogènes de la gangrène gazeuse ne se fait pas avec la culture, mais avec les spores, ce qu'admettent aussi Ciornaia et Kovtunovici, bien qu'ils soutiennent, pour certains cas à évolution foudroyante, la possibilité de la contamination avec une culture développée en milieu extérieur (28).

MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL

1. Les expériences d'immunisation active ont été réalisées sur 84 cobayes, immunisés avec l'anatoxine vibrion septique, œdematiens ou perfringens, concentrés, purifiés et adsorbés sur phosphate d'aluminium. Les cobayes ont été infectés ensuite par voie intramusculaire avec des suspensions de spores dans une solution de chlorure de calcium (1—5 spores); 45 cobayes ont servi comme témoins, (infectés sans immunisation préalable). Le matériel et les méthodes utilisés ont été exposés dans les notes relatives à l'immunisation active et nous ne reviendrons plus là-dessus (29, 30, 31). Les résultats de ces expériences sont synthétisés dans le tableau I.

Ainsi qu'il ressort du tableau I, les animaux auxquels une immunité active a été conférée, ont présenté une remarquable résistance à l'infection avec le *Cl. perfringens* et une résistance significative à l'infection au *Cl. œdematiens* et *vibrion septique*. Toujours est-il, que les animaux qui sont morts ultérieurement ont survécu de beaucoup les témoins.

Alors que les témoins sont morts présentant le tableau classique des toxi-infections gangréneuses généralisées, avec lésions diffuses au point d'inoculation, où nous n'avons jamais décelé macroscopiquement la présence de pus, ni

Tableau I

Résistance à l'infection homologue des cobayes immunisés activement avec différentes anatoxines gangréneuses en comparaison avec les cobayes non-immunisés

Cobayes infectés avec:	Catégorie	UA/ml sérum sanguin	DCL spores inject.	morts / total	Survie après infection des animaux morts ultérieument (en jours)
V. septique	immunisés	0,5—10	1	3/9	2
		5	2	1/1	2
	témoins	—	1	7/10	2
Cl. perfringens	immunisés	>0,1<0,5—>20	2—250	5/50	10—23
	témoins	—	1	19/19	1— 4 *)
Cl. oedematiens	immunisés	5—50	1—3	3/18	14—21
		10—50	150	5/6	3—14
	témoins	—	1	16/16	2— 4

*) Trois cobayes sont morts à: 7—8—16 jours

microscopiquement un afflux leucocytaire, les animaux immunisés, qui ont survécu, ont présenté une évolution totalement différente.

I. La plupart des cobayes immunisés antiperfringens ou antivibrion septique, et une grande partie de ceux immunisés antiœdematiens, n'ont pas montré de phénomènes pathologiques apparents, preuve qu'ils étaient parfaitement immuns.

II. Une proportion d'environ 30% des cobayes infectés au *Cl. perfringens*, approximativement 70% au *Cl. œdematiens* et un cobaye au *vibrion septique*, ont présenté des phénomènes pathologiques localisés et notamment:

a) un type de lésions rencontrées seulement chez quelques cobayes infectés au *Cl. perfringens* est représenté par nécrose du muscle, du tissu cellulaire sous-cutané et de la peau avec hémorragie s'étendant du point d'injection sur la cuisse et l'abdomen, jusqu'aux membres antérieurs. Après élimination d'une escarre, la plaie guérissait graduellement, laissant une cicatrice, parfois rétractile, d'autrefois souple, les poils repoussant après la guérison totale (fig. 1, a, b). Cette évolution de la maladie expérimentale n'a pas été suivie de réaction leucocytaire et suggère, d'après son aspect, l'action de la collagénase (toxine kappa) ou du « facteur invasif » (32) (selon les interprétations de certains auteurs).

b) Les autres cobayes ont présenté une maladie expérimentale, sous forme d'abcès localisé, formé en quelques jours, évoluant pendant quelques semaines par une massive production de pus, évacué soit spontanément, soit par incision et compression manuelle, répétées parfois à plusieurs jours d'intervalle. Les premiers jours — avant l'ouverture — l'abcès était strictement spécifique, présentant un afflux leucocytaire énorme et une multiplication variable de l'agent pathogène inoculé, à morphologie typique, parfois allongé, parfois sporulé. La majorité des germes étaient extra-leucocytaires; on décelait quelquefois aussi des formes phagocytées. Ultérieurement, les abcès se sont sur-infectés; la flore était constituée surtout par des germes pyogènes banaux, les germes anaérobies injectés initialement sont rarement observés (fig. 2 a, b, c, d, e f, g). Pendant toute cette période les animaux n'ont présenté aucune altération de l'état général, bien que des germes à haute toxicité aient été continuellement isolés des abcès

(4 souches de *Cl. perfringens*, avec une toxine titrant 5 à 7 UC/ml, 3 souches de *Cl. œdematiens* avec une toxine titrant 5.000 — > 10.000 DLM/ml).

Les abcès étaient situés en plein tissu musculaire, c'est pourquoi la guérison s'est produite avec pertes musculaires massives (jusqu'à 1/3-1/2 de la masse totale), mais avec des cicatrices cutanées minimes (fig. 3 a, b).

2. Partant de ces observations, nous avons considéré nécessaire de les compléter par une expérience d'immunisation passive, afin de voir si, dans ce cas également, le mécanisme immunologique est pareil à celui rencontré dans l'immunisation active.

Huit cobayes ont reçu par voie intrapéritonéale des doses de 1-100 UA sérum œdematiens et 8 autres, les mêmes doses de sérum antiperfringens. Les deux séries ont reçu, en même temps, par voie intramusculaire des suspensions homologues de spores — soit 2 DCL spores œdematiens, respectivement 5 DCL spores perfringens.

Le résultat de cette expérience est enregistré dans le tableau II.

Contrôlant ces cobayes pendant une période d'un mois, on a pu remarquer que les animaux immunisés passivement antiperfringens, ont présenté une réaction similaire à celle des animaux immunisés activement, mais moins accentuée.

Intéressant est le cas du cobaye protégé par 50 UA sérum, qui a présenté un abcès typique traînant et qui est probablement mort après l'élimination de l'antitoxine injectée. Nous soulignons, qu'aucun des cobayes immunisé activement et présentant des abcès n'a succombé, après avoir survécu une aussi longue période de temps, attendu que dans ce cas la réserve d'antitoxine ne peut s'épuiser en présence de l'agent pathogène; au contraire, il est probable que ce dernier stimule la production de nouvelles quantités d'antitoxine. A l'autopsie de ce cobaye, on a isolé de la plaie une souche de *Cl. perfringens* intensivement toxigène (6 UC/ml) en culture pure.

Tableau II

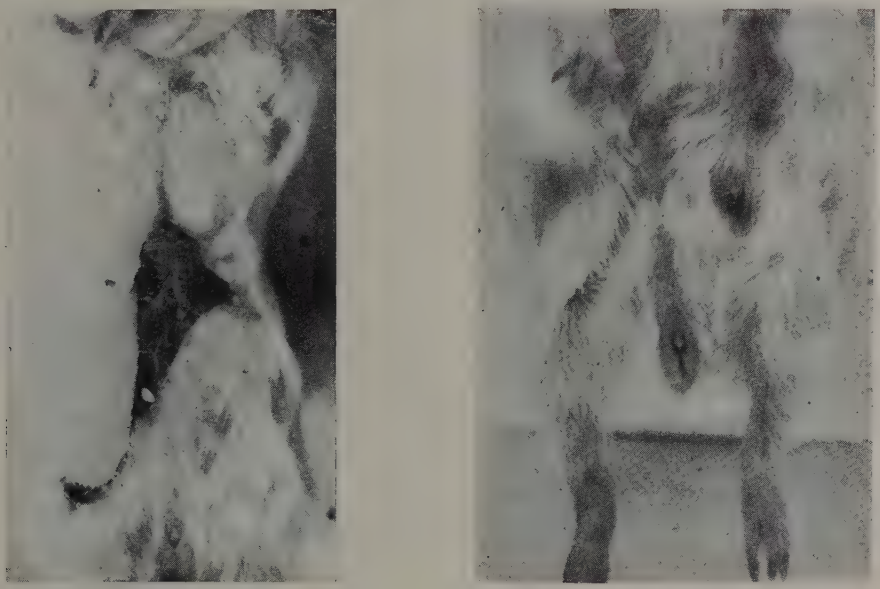
Résistance des cobayes immunisés passivement par différentes doses de sérum antitoxique antiperfringens ou antioedematiens à l'infection avec la suspension de spores homologues

Cl. perfringens				Cl. oedematiens			
Sérum injecté i/p—U.A	Spores DCL	Nombre cobayes	Résultat	Sérum inject. i/p UA	Spores DCL	Nombre cobayes	Résultat
1	5	2	— —	1	2	2	+3+ 4 jours
10	5	2	— —	10	2	2	+3+ 5 jours
50	5	2	— + 27 jours	50	2	2	+2+ 8 jours
100	5	2	— —	100	2	2	— +15 jours

—: survie après 30 jours
+: mort

Aucun des cobayes recevant une immunisation passive au *Cl. œdematien* n'a présenté de réaction cellulaire leucocytaire. La maladie a évolué comme chez les témoins non-immunisés (malgré le fait qu'à mesure de l'augmentation de la quantité d'antitoxine administrée, la durée de vie se prolongeait), présentant une nécrose locale et microscopiquement une absence de leucocytes (fig. 4).

Il résulte donc, qu'aussi bien dans le cas de l'infection avec *Cl. perfringens* que surtout dans celui à *Cl. œdematiens*, l'immunisation active est supérieure à l'immunisation passive.



Photographie 1. Nécrose intense de la peau, du tissu cellulaire souscutané et du muscle chez un cobaye immun, infecté avec spores de *Cl. perfringens*.

a) 25 jours après l'infection; *b)* guéri, approximativement 2 mois à partir de l'infection.

DISCUSSION

Les problèmes soulevés par la présente note sont complexes et le matériel expérimental présenté ne constitue qu'une introduction à leur solution. Néanmoins, nous croyons que dès à présent, les observations enregistrées permettent les suivantes conclusions:

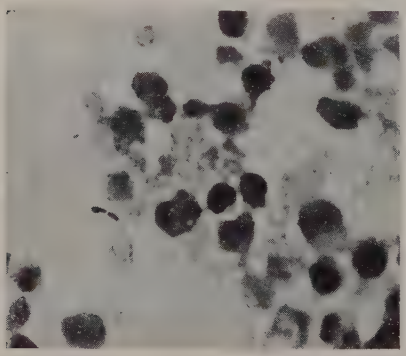
1. Notre matériel expérimental confirme une fois de plus la nature strictement antitoxique de l'immunité antigangréneuse, la dépendance de l'immunité de l'antitoxine circulante.

Ceci expliquerait probablement aussi la différence nette qui s'observe entre l'intensité de la réaction immunologique de l'organisme vis-à-vis des différents germes gangréneux. L'immunité envers le *Cl. œdematiens* présente une haute intensité antitoxique (dans le cas de l'administration d'une toxine préformée) et une faible capacité de protection antimicrobienne, tandis que l'immunité antiperfringens, par contre, offre une faible intensité antitoxique (dans le cas d'une inoculation de la toxine préformée) et une grande capacité de protection antimicrobienne; l'immunité antivibrion septique est faible, aussi bien sous le rapport

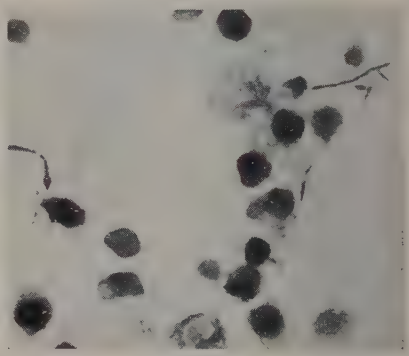
antitoxique qu'antimicrobien (30, 31, 32). Nous rappelons que dans tous les cas, 1 DCL a été représentée par quelques spores (1-5).

Le *Cl. perfringens*, espèce peu toxigène, peut être jugulé même en présence d'un nombre relativement élevé de spores par une quantité relativement réduite d'antitoxine circulante. Le *Cl. oedematiens*, espèce hautement toxigène, peut être difficilement jugulé, même en présence d'un petit nombre de spores et d'une quantité relativement élevée d'antitoxine. Le *vibrion septique*, espèce toxigène et à fort pouvoir invasif et de multiplication, rend difficile la défense de l'organisme, même après l'immunisation.

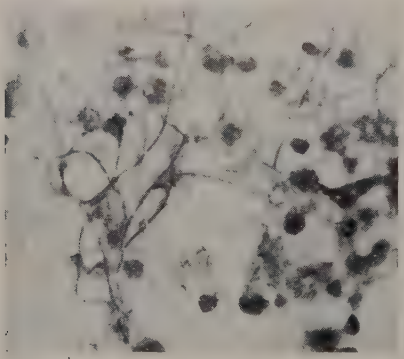
Figure 2. — Différents frottis des plaies de quelques cobayes à immunisation active, infectés avec spores de *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* ou *vibrion septique*, présentant une intense réaction leucocytaire.



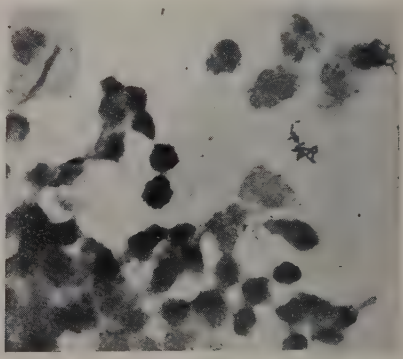
a) Cobaye immun, infecté avec spores de *Cl. perfringens*; forme sporulée.



b) Cobaye immun infecté avec spores de *Cl. oedematiens*; forme sporulée.

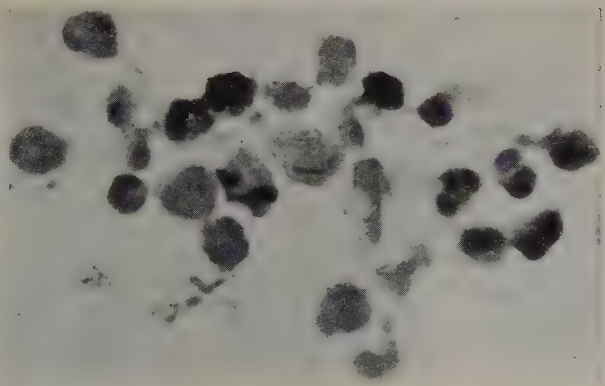


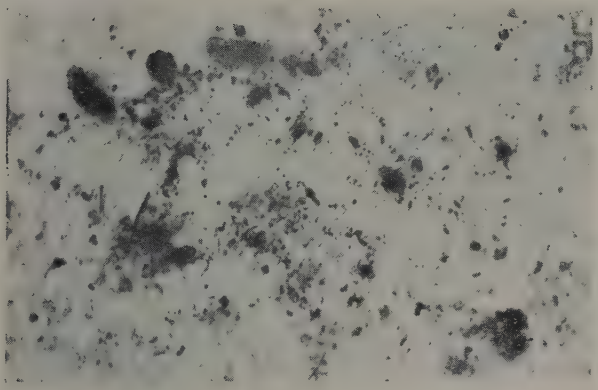
c) Cobaye immun, infecté avec spores de *Cl. oedematiens*. Nombreux bacilles allongés et en chaîne.



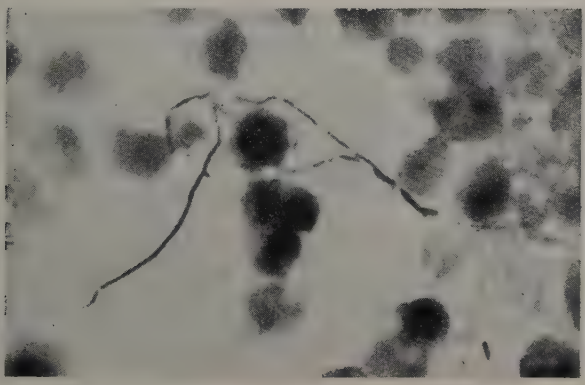
d) Cobaye immun, infecté avec spores de *Cl. perfringens*. Deux groupes de bacilles. Ce cobaye, inoculé avec 100 D.C.L. spores a guéri.

e) Cobaye immun, infecté avec spores de *Cl. oedematiens*. Phagocytose.



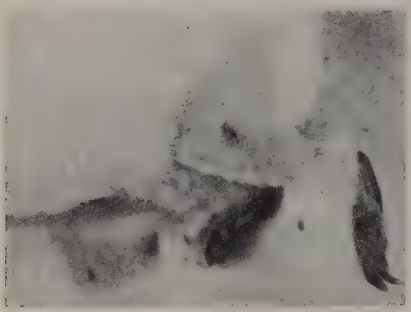


f) Cobaye immun, infecté avec spores de *Cl. perfringens*, (3 semaines après l'infection). Au milieu, un germe sporulé. Infection massive sur-ajoutée.

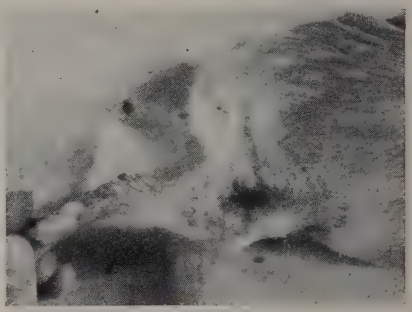


g) Cobaye immun, infecté avec spores de *vibrion septique*. Formes en chaîne et allongées.

Figure 3. — Aspect des cobayes infectés expérimentalement et guéris.



a) Cicatrice du cobaye dont on a récolté le frottis de la fig. 2 b. Guérison 2 mois après infection;



b) Cicatrice du cobaye dont on a récolté le frottis de la fig. 2 f. Guérison 2 mois ap ès infection.

La différence est radicale dans le cas de l'immunité passive, quand nous pouvons constater que ni les quantités d'antitoxine de 100 AU ne protègent complètement les cobayes contre l'infection à *Cl. œdematiens* alors que 1 UA sérum antiperfringens les protège contre l'infection respective. Ici ressort nettement l'avantage de l'immunisation active qui, produisant une alerte physiologique de l'organisme, lui accorde la capacité de répondre à l'attaque du germe pathogène par l'élaboration d'anticorps supplémentaires.

STEFANESCO et GORUN (33) ayant administré préventivement au cobaye un sérum polyvalent antigangréneux, obtiennent à un taux marqué la protection des animaux contre l'infection mixte de *Cl. perfringens, vibrion septique, Cl. oedematiens* et *Cl. histolyticum*. Cependant, le fait que le *Cl. œdematiens* participe seulement avec 15% au nombre de corps microbiens injectés (en condition d'anaérobiose relative), de même que le fait qu'aux ensemencements de la plaie, du sang et des organes on a isolé le plus souvent le *Cl. perfringens*, ne nous permettent pas de nous rendre compte si chez ces animaux s'est développé régulièrement l'infection au *Cl. œdematiens*.

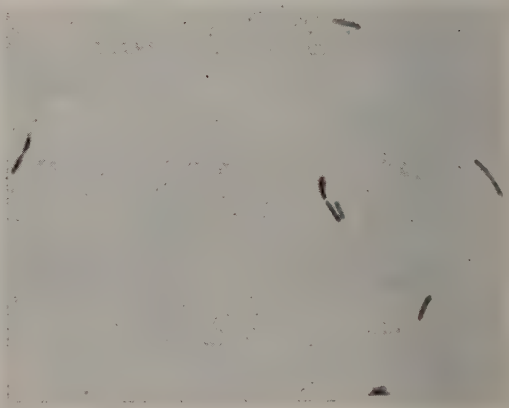


Figure 4. — Frottis d'un cobaye à immunisation passive avec 50 U.A. sérum antioedematiens, et injecté par 2 D.C.L. *spores oedematiens*. Mort du cobaye. Forme sporulée. Absence de la réaction leucocytaire.

2. Les faits observés par nous ne peuvent s'expliquer du point de vue de la théorie de l'origine « tissulaire » de la toxémie dans la gangrène gazeuse, provoquée par le *Cl. perfringens*. Cette idée, suggérée au moins 40 années auparavant (34), a été systématisée pendant la période de la seconde guerre mondiale et celle qui l'a suivie immédiatement après, comme une théorie selon laquelle ce ne serait pas l'alpha-toxine qui produirait la toxémie, respectivement la mort, mais les produits non-spécifiques de décomposition, résultant de l'action locale sur le muscle, soit de l'alpha-toxine, soit de l'hyaluronidase, ou de la collagénase (toxine kappa) (21, 22, 23, 24).

Notre expérience réalise une disjonction nette entre l'effet local et l'effet général de l'infection, chez les cobayes immunisés; plus encore, il n'existe aucun parallélisme entre l'extension de la lésion locale et la gravité de l'altération de l'état général. Même les destructions massives musculaires ou cutanées, causées par le *Cl. perfringens*, *Cl. œdematiens* ou le *vibrion septique*, n'ont affecté l'état général des animaux et n'ont pas coïncidé avec l'apparition des signes cliniques de la toxémie gangréneuse.

On pourrait objecter que nous avons affaire ici avec une infection qui, dans les conditions de neutralisation de l'alpha-toxine, réalise un aspect clinique peu habituel (réaction purulente) et que seule l'action de l'alpha-toxine sur le muscle produirait les dits produits toxiques hypothétiques, capables de provoquer la toxémie. A ceci on peut répondre par les cas où la lésion locale s'est présentée sous forme d'une nécrose étendue, musculaire et cutanée, avec escarre consécutive, réaction rencontrée aussi chez les cobayes non-immunisés qui ont reçu moins de 1 DCL spores perfringens et qui est typique en tant que nécrose gangréneuse. Si ces réactions sont mises sur le compte de la collagénase, hyaluronidase ou « facteur invasif », l'hypothétique substance de décomposition musculaire, produite seulement par l'alpha-toxine, reste à être prouvée.

De tout ce qui a été dit plus haut, il semble résulter que seule l'action générale ou centrale des toxines gangréneuses, et non l'action locale, est capable de causer la toxémie et la mort dans cette affection.

Le fait que toute une série d'auteurs n'ont pas réussi à trouver, dans les cas cliniques de gangrène gazeuse, l'alpha-toxine dans les tisssus affectés ou dans le sang, pourrait s'expliquer par la résorption et la fixation centrale très rapide de la toxine à mesure de sa formation en petites quantités dans le foyer. On sait que l'administration par voie sanguine d'une quantité relativement grande de n'importe laquelle des toxines gangréneuses, aux animaux de laboratoire, peut conduire à la mort instantanée et rien ne nous empêche de croire qu'aussi bien dans le cas d'une injection avec une dose limite de toxine, la fixation est tout aussi rapide et seul l'effet léthal est plus tardif. L'effet de la fixation de petites doses répétées de toxine (résorbées du foyer infectieux) est cumulatif et la mort pourrait survenir même avant la totalisation de 1 DLM, par le phénomène de la sensibilisation paradoxale de BEHRING (35).

Dans les mêmes cas cliniques on n'a pas trouvé d'hémolyse intravasculaire, ce qui est également considéré comme une preuve de l'absence de la toxine alpha du torrent circulatoire. Par l'hypothèse de la résorption répétée en petites quantités de la toxine, ce phénomène aurait également son explication.

3. Le rôle du facteur de défense phagocytaire dans l'immunité antigangréneuse n'a pas été éclairci jusqu'à présent. Il existe, depuis le début même de

l'étude des toxines gangréneuses, de nombreuses indications sur leur rôle chimiotactique négatif ou leucolytique (36, 37, 38, 39, 40, 41).

D'autre part, la tendance à étudier et reconnaître le rôle du facteur phagocytaire dans l'immunité antigangréneuse, initiée pendant la période de l'essor de la théorie de METCHNIKOFF (42, 43, 44, 45) a été presque abandonnée après la victoire de la théorie humorale dans le domaine de l'immunité antitoxique; peu d'auteurs ont essayé de faire une synthèse entre ces deux théories.

Ainsi, LECLAINCHE et MOREL (46), ont constaté pour la première fois que le sérum antivibrion septique administré passivement aux animaux d'expérience, active la phagocytose, mais ils interprètent d'une manière erronnée ce phénomène et, notamment, comme résultant d'une action de stimulation de l'organisme.

WEINBERG et SEGUIN (14), au début de l'emploi du sérum antitoxique antigangréneux, relatent le cas de quelques soldats avec gangrène gazeuse provoquée par différents agents étiologiques, à qui l'administration répétée de sérum antitoxique polyvalent a conduit chaque fois à l'activation de la leucocytose et ensuite de la phagocytose.

STEWART (47) constate que la résistance conférée aux cobayes, immunisés activement antiperfringens, et qui avaient une antitoxine circulante, se manifeste par le fait que les germes introduits dans le péritoine sont fortement phagocytés, alors que chez les témoins non-immunisés, bien que présentant un exsudat leucocytaire péritonéal, la phagocytose n'a pas été observée. La provocation expérimentale de la leucopénie a eu comme suite la mort des cobayes, immunisés dans les mêmes conditions que les témoins.

L'auteur a observé aussi des phénomènes similaires après l'immunisation passive.

Selon GLEBOVA, citée par SNEERSON (48), les leucocytes mêmes de l'animal immun, en absence de son sérum, posséderaient une activité phagocytaire plus intense sur les germes respectifs, tandis que chez les animaux normaux, les leucocytes, suspendus en sérum immun, présentaient aussi une activité phagocytaire.

SNEERSON (48) constate que les animaux à immunité active, injectés par voie intrapéritonéale, phagocytaient dans la même mesure (c'est-à-dire intensément) les bacilles perfringens lavés de la toxine, que les témoins non-immuns. Mais si l'on introduisait la culture, qui contenait aussi de la toxine, les témoins ainsi que les cobayes non-immunisés mourraient. Selon l'opinion même de l'auteur ceci s'explique par le fait que les animaux immunisés possédaient un titre antitoxique non-correspondant.

Nos expériences ont l'avantage de mettre en évidence la réaction leucocytaire, non pas dans le péritoine où elle est presque toujours particulièrement active, mais dans les abcès provoqués dans le tissu musculaire, c'est-à-dire dans des conditions rappelant l'infection spontanée. Le fait que dans nos expériences la leucocytose n'est accompagnée que dans une petite mesure de phagocytose, n'infirme pas son rôle de protection. Selon GASTINEL (40), l'action antimicrobienne des leucocytes peut être réalisée aussi par les ferments cellulaires, même en absence de la phagocytose.

Nos expériences indiquent le rôle des leucocytes comme facteur général dans l'immunité antigangréneuse, ce facteur étant valable dans la même mesure pour le *Cl. oedematiens*, le *vibrion septique* et le *Cl. perfringens*.

Des données de la littérature (47) et de nos expériences, il résulterait que l'immunité antigangréneuse possède deux componentes nettement distinctes:

1. Une componente spécifique — l'antitoxine, qui peut se produire activement ou peut être introduite passivement dans l'organisme.

2. Une componente non-spécifique — les phagocytes, qui exercent leur rôle défensif en présence de l'antitoxine, qui anihile ou prévient l'effet chimiotactique négatif de la toxine. Par comparaison à l'immunité passive, l'immunité active favorise beaucoup plus l'apport et l'activité des cellules phagocytaires. Comme élément phagocytaire on a mis en évidence la présence de leucocytes polynucléés. Reste à des expériences futures, plus détaillées, d'élucider le rôle éventuel des macrophages.

Par l'effet de l'infection gangréneuse sur la leucocytose et la phagocytose on pourrait expliquer le rôle exercé par la flore associée dans chacun des cas de gangrène gazeuse prise à part, rôle parfois favorisant, d'autrefois antagoniste. (49, 50).

METCHNIKOFF avait déjà suggéré que les phagocytes auraient aussi un rôle antitoxique direct dans l'immunité antitétanique (51). METALNIKOV (52) a constaté que les chenilles, habituellement sensibles à la toxi-infection au *Cl. perfringens* et qui ne produisent jamais des antitoxines, peuvent se défendre dans certaines conditions contre la dite toxi-infection par l'intermède des cellules phagocytaires. La découverte très récente de MEISEL (53), à savoir, que les formes végétatives, de même que les spores de *Cl. perfringens*, contiennent de grandes quantités d'alpha-toxine endocellulaire, pendant toutes les périodes de la culture « in vitro » réactualise ce problème.

RÉSUMÉ

1. On constate sur un nombre de 84 cobayes immunisés activement avec l'anatoxine perfringens, œdematiens ou vibrion septique, injectés ultérieurement avec les spores correspondantes, que la résistance à l'infection est strictement dépendante de la présence de l'antitoxine circulante.

L'immunité antiperfringens est faible sous l'aspect toxique et puissante du point de vue de l'effet antimicrobien; l'immunité antiœdematiens présente un aspect inverse, tandis que l'immunité antivibrion septique est faible, tant sous aspect toxique qu'antimicrobien.

Ceci pourrait s'expliquer par la différence qualitative, d'espèce, entre les différentes toxines gangréneuses.

La différence s'accentue dans le cas de l'immunisation passive du cobaye, quand même 100 UA antitoxine œdematiens n'ont le pouvoir défensif antimicrobien de 1 UA antitoxine perfringens.

L'immunité antitoxique acquise par voie active, est plus efficace que l'immunité passive.

2. Chez les cobayes immuns et résistants à l'infection avec spores (par voie intramusculaire) de *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* ou *vibrion septique*, on observe fréquemment des réactions locales, sous forme d'abcès intramusculaire localisé; les germes clostridiens constatés dans les abcès par examen bactérioscopique et isolés du pus se sont avérés fortement toxigènes. Les abcès présentent une intense

réaction leucocytaire mais on n'a réussi à mettre en évidence qu'une faible phagocytose.

On met en discussion le rôle de défense du facteur cellulaire non-spécifique — les phagocytes — déclenché par la présence du facteur spécifique — antitoxine.

3. On constate une disjonction nette entre les effets locaux et généraux de l'infection avec les agents pathogènes de la gangrène gazeuse. Cette constatation ne peut s'expliquer par le prisme de la théorie « tissulaire » de la toxémie dans la gangrène, mais seulement dans le cas où la toxémie et la mortalité seraient considérées comme étant la suite de l'action centrale ou générale des exotoxines spécifiques des différents germes de la gangrène gazeuse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dible J. H., McLennan J. D. et Barber M. — Recent advances in bacteriology, 3-d ed. London, 1951.
2. Bernheimer A. — J. Immunol., 1947, **56**, 317.
3. Tytell A. A. et coll. — J. Bact., 1946, **51**, 621.
4. Adams M. H. — J. Immunol., 1947, **56**, 323.
5. Tytell A. A. et coll. — J. Immunol., 1947, **55**, 233.
6. Altemeier W. A. et coll. — Arch. Surg. (Chicago), 1952, **65**, 633.
7. Volkova Z. M. et Zelevinskaia S. A. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No. 4, 77.
8. Vigodcikov G. V., Volkova Z. M. et Zelevinskaia S. A. — du livre Assoţiirovannîie profilakticeskie preparatî protiv ranevîh infekţii, Moscou, 1959, 3.
9. Cerkas G. P. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1958, N° **7**, 60.
10. Cerkas G. P. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1959, N° **9**, 90.
11. Manolov D., Vranceva S. et Dencev V. — Communication au « Symposium International d'Immunologie » — Opatija, 1959.
12. Lettl A et coll. Communication au « Symposium International d'Immunologie » — Opatija, 1959.
13. Conclusions de la Commission sur la Gangrène Gazeuse — « Symposium International d'Immunologie » — Opatija, 1959.
14. Weinberg M. et Seguin P. — La Gangrène Gazeuse, Paris, 1918.
15. Miles A. A. et Miles E. M. — Brit. J. Exp. Pathol., 1943, **24**, 95.
16. Evans D. G. — Brit. J. Exp. Pathol., 1943, **24**, 31.
17. Evans D. G. — J. Path. a Bact., 1943, **55**, 427.
18. Evans D. G. — Brit. J. Exp. Pathol., 1947, **28**, 24.
19. Vigodcikov G. V., Volkova Z. M., Zelevinskaia S. A. et Larina I. A. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No. 10, 120.
20. Certkova F. A. et Sain E. S. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1953, **11**, 97 (trad.)
21. Stammers P. A. R., McLennan J. D., MacFarlane M., Hartley P. et Evans D. G. — Proc. Roy. Soc. Med., 1946, **39**, 291.
22. McLennan J. D. et Macfarlane R. G. — Lancet, 1945/II, 301.
23. Macfarlane R. G. McLennan J. D. — Lancet, 1945/II, 328.
24. Heyningen W. E. van — du livre: Mechanisme of microbiol pathogenicity, Cambridge University Press, 1955, 17.
25. Babeş V. — Cent. Pract. of Medicine, 1897, **17**, 121—186 2-nd ed., 1902, 672.
26. Bull C. G. et Pritchett I. W. — J. Exp. Med., 1917, **26**, 119.
27. Robertson M. — du livre A System of Bacteriology in relation to Medicine, 1929, 3, 225.
28. Ciornaia L. A. et Kovtunovici G. P. — Gazovaia Infekţia, Gosmedizdat U.R.S.S., Kiev, 1950, 103.
29. Bittner J. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 181.
30. Olaru A., Bittner J., Kranzdorf H., Voinesco V. et Tulburi V. — Ibid. 1960, **19**, 447.

31. Olaru A., Bittner J., Kranzdorf H., Voinesco V. et Tulbure V. — Ibid, 1960, **19**, 416
32. Smith D. T., Conant N. F. et coll. Zinsser's Textbook of Bacteriology, New-York 1952, 542.
33. Stefanesco V. et Gorun V. — Arhivele Romîne de Epidemiologie şi Microbiologie, Studii şi Cercetări, Bucureşi Editura Medicală, 1956, 273.
34. Besson A. — Ann. Inst. Pasteur, 1895, **9**, 179.
35. Morgunov I. N. — Bakteriinîe toksinî i anatoksinî, Kiev, 1959, 55.
36. Leclainche E. et Valee H. — Ann. Inst. Pasteur, 1909, **14**, 202.
37. McCampbell E. F. — J. Inf. Dis., 1909, **6**, 537.
38. Mollaret et Delorme — Presse Médicale, 1950, **58**, 361.
39. Robb-Smith A.H.T. — Lancet, 1945, **249**, 362.
40. Gastinel P., Fasquelle R. et Barbier P. — Eléments d'immunologie générale, Paris, Masson, 1955, 194.
41. Ruffer A. — Ann. Inst. Pasteur, 1891, **5**, 673.
42. Piana G. P. et Galli-Valerio B. — Ann. Inst. Pasteur, 1895, **9**, 258.
43. Leclainche E. et Vallée H. — Ann. Inst. Pasteur, 1902, **16**, 614.
44. Metalnikov S. — C. R. Soc. Biol., (Paris), 1920, **83**, 817.
45. Bliss E. A. et Long P. H. — J. Amer. Med. Assoc., 1937, **109**, 1524.
46. Leclainche E. Morel C. — Ann. Inst. Pasteur, 1901, **15**, 1.
47. Stewart S. E. — Publ. Health Rep., 1943, **59**, 1277.
48. Sneerson A. N. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No. 4, 83.
49. Weinberg M., Nativelle R. et Prévot A. R. — Les microbes anaérobies, Paris, Masson, 1937, 193.
50. Firsova K. F. — Sbornik naucinîh trudov Kazanskogo Instituta Epidemiologhii i Mikrobiologhii, 1949, **1**, 203.
51. Metchnikoff I. I. — Ann. Inst. Pasteur, 1898, **12**, 263.
52. Metalnikov S. — Ann. Inst. Pasteur, 1926, **40**, 787.
53. Meisel H. — Communication au « Symposium International d'Immunologie » — Opatija, 1959.

НЕКОТОРЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ, КАСАЮЩИЕСЯ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОГАНГРЕНОЗНОГО ИММУНИТЕТА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

На основании исследований, проведенных на 84 морских свинках активно иммунизированных анатоксином перфрингенс, эдематиенс или септического вибриона, установлено, что устойчивость против инфекций строго зависит от наличия циркулирующего антитоксина.

Иммунитет против палочки перфрингенс является слабо напряженным в антитоксическом направлении, но в то же время сильным с точки зрения антимикробного действия, иммунитет против палочки эдематиенс ведет себя наоборот, а иммунитет против септического вибриона слабо напряжен как в антитоксическом отношении, так и в антимикробном.

Эти данные объясняются качественными, видовыми различиями между разными гангренозными токсинами.

Отличия более подчеркнуты при пассивной иммунизации морских свинок, при которой даже 100 АЕ антитоксина не дают эффекта противомикробной защиты, равный эффекту, вызываемому 1 АЕ антитоксина перфрингенс.

Антитоксический иммунитет, полученный активным путем, эффективнее пассивного иммунитета.

У иммунных морских свинок, устойчивых против заражения спорами палочки перфрингенс, эдематиенс или септического вибриона, внутримышечным путем, часто отмечаются местные реакции под видом внутримышечных локализованных абсцессов, содерживаюших клостридии, которых удается выделить из абсцессов под видом высокотоксигенных штаммов. В абсцессах отмечается сильная лейкоцитарная реакция, сопровождающаяся однако слабо выраженным фагоцитозом.

Обсуждается защитная роль неспецифического клеточного фактора- фагоциты- под влиянием специфитеского фактора-антитоксина.

3. Установлена явная независимость между местными и общими эффектами инфекции, вызванной возбудителями газовой гангрены. Данное обстоятельство невозможно объяснить с позиции « клеточной» теории токсемии при газовой гангрене; это возможно только при условии считать токсемию и смертность прямыми последствиями центрального или общего действия специфических экзотоксинов отдельных возбудителей газовой гангрены.

EINIGE ERGEBNISSE VON VERSUCHEN ÜBER DIE MECHANISMEN DER GASBRANDIMMUNITÄT.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei 84 aktiv mit den Toxoiden von *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* und *Vibrio septicus* immunisierten und anschliessend mit den entsprechenden Sporen infizierten Meerschweinchen wurde festgestellt, dass der Widerstand gegen die Infektion streng von der Anwesenheit des Antitoxins im Blutkreislauf abhängig ist.

Bei der Perfringensimmunität ist die antitoxische Wirkung gering und die antibakterielle Wirkung stark, mit der Oedematiensimmunität verhält es sich umgekehrt und die Immunität gegen *Vibrio septicus* ist schwach, sowohl hinsichtlich der antitoxischen, als auch der antibakteriellen Wirkung.

Dies lässt sich durch den qualitativen, speziesbedingten Unterschied zwischen den verschiedenen Toxinen der Gasödembazillen erklären.

Der Unterschied tritt noch stärker im Falle der passiven Immunisierung des Meerschwein chens, hervor, wo selbst 100 AE Oedematiensantitoxin nicht die gleiche bakterielle Schutzwirkung ausüben wie 1 AE Perfringensantitoxin.

Die aktiv erworbene antitoxische Immunität ist wirksamer als die passiv erworbene.

2. Bei immunen und widerstandsfähigen Meerschweinchen, die intramuskulär mit Sporen von *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* oder *Vibrio septicus* infiziert werden, beobachtet man oft örtliche Reaktionen in der Gestalt lokalisierter intramuskulärer Abszesse, aus welchen sich hochtoxigene Gasödembazillen isolieren lassen. Die Abszesse weisen eine starke leukozytäre Reaktion auf, doch konnte Phagozytose nur in geringem Ausmass nachgewiesen werden.

Es wird die Abwehrrolle des unspezifischen Zellfaktors — der Phagozyten — besprochen, insofern er durch den spezifischen Faktor — das Antitoxin — ausgelöst wird.

3. Zwischen den örtlichen und den Allgemeinauswirkungen der Infektion mit den pathogenen Keimen des Gasbrandes wurde eine ausgeprägte Dissoziation festgestellt. Vom Standpunkt der « tissulären » Theorie der Toxämie bei Gasbrand, lässt sich dies nicht erklären, sondern nur wenn man die Toxämie und Letalität als eine Folge der zentralen oder allgemeinen Wirkung der spezifischen Exotoxine der Gasbrandbazillen auffasst.

SOME EXPERIMENTAL DATA CONCERNING THE MECHANISMS OF ANTI-GANGRENOUS IMMUNITY

SUMMARY

1. Eighty-four guinea-pigs have been actively immunized with perfringens, oedematiens, and septicum toxoids and subsequently infected with the corresponding spores. The resistance to infection was found to be strictly dependent on the presence of antitoxin in the blood.

Anti-perfringens immunity is weak as regards the antitoxic, and strong as regards the antimicrobial effect, anti-oedematiens immunity exhibits an inverse pattern, and anti-septicum immunity is weak in both respects.

This may be accounted for by the qualitative differences between the various toxins, in relation with the respective species of gangrene bacilli.

The difference becomes more conspicuous in the case of passive immunization of the guinea-pig, when not even 100 A.U. of oedematiens antitoxin will exert the same protecting antimicrobial effect as 1 A.U. of perfringens antitoxin.

Actively acquired antitoxic immunity is more effective than passively conferred immunity.

2. In immune guinea-pigs which resist the infection by the intramuscular route with spores of *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens*, or *Cl. septicum*, local reactions in the shape of intra-

muscular abscesses were often seen to develop. From these abscesses highly toxigenic strains of Clostridia could be isolated. An intense leukocytic reaction was present but only a slight degree of phagocytosis could be demonstrated.

The part played by the nonspecific cellular factor—phagocytosis—as released by the presence of the specific factor — antitoxin — is discussed.

3. A clear-cut disjunction was found to exist between the local and the systemic effects of infection with the pathogenic agents of gas-gangrene. This cannot be accounted for on the basis of the « tissular » theory of toxaemia in gas-gangrene, but solely by considering toxaemia and lethality as consequences of the central or general action exerted by the specific exotoxins of the various microbial agents of gas-gangrene.

RECHERCHES SÉROLOGIQUES SUR L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES CHEVAUX

par

M. Iliesco et Al. Ţurcanu

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Hématologie)

Le diagnostic de laboratoire de l'anémie infectieuse des chevaux (A.I.C.) constitue un problème qui n'a pas encore été résolu. Aucun des procédés proposés n'a pu être vérifié dans la pratique. Ceci est dû, d'un côté, au fait qu'il a été impossible, jusqu'à présent, de trouver un animal réceptif (à part les équidés) et, d'un autre côté, à l'absence de connaissances précises sur les mécanismes qui interviennent dans la pathogénie de cette maladie.

Comme il s'agit d'une infection à virus, nous avons examiné, dans les recherches exposées plus bas, si les réactions plus ou moins spécifiques, qui se sont montrées utiles dans le diagnostic d'autres viroses, ne pourraient également servir dans le diagnostic de l'A.I.C. Dans ce but, nous avons eu recours à:

— l'autohémagglutination à froid, utilisée dans le diagnostic des pneumonies atypiques de l'homme;

— l'hétérohémagglutination, à l'instar des réactions dans la mononucléose infectieuse.

L'anémie étant le symptôme principal de la maladie, nous avons essayé aussi le test antiglobulinique (Coombs — Mourant — Race), généralement utilisé pour le diagnostic des anémies hémolytiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux d'expérience : 6 poulains inoculés par voie intraveineuse avec du sérum d'animaux, souffrant d'anémie infectieuse, filtré.

Prélèvement : 5 ou 6 prises de sang ont été effectuées pour chaque animal, la première avant et les autres à des intervalles de 7 à 10 jours après l'infection. Le sang a été prélevé de manière stérile de la veine jugulaire, en deux tubes, dont l'un contenait de la solution d'Alsever (deux parties de solution pour une partie de sang). Ce tube était gardé au frigidaire (+ 4°C) jusqu'à l'utilisation des hématies. L'autre tube (sang tel quel) était immédiatement placé au bain marie à 37° — 40°C, jusqu'à la coagulation du sang et à la rétraction du caillot (2 à 3 heures). Le sérum était ensuite décanté rapidement, centrifugé à chaud (37° — 40°C) et re-décanté pour l'éloignement complet des hématies. De cette manière toute fixation des agglutinines à froid sur les propres hématies a été

évitée. Le sérum libéré d'hématies était gardé au frigidaire (+ 4°C). Toutes les manipulations ont été exécutées dans des conditions de stérilité.

L'iso-agglutination a été exécutée avec des hématies de poule, de cobaye, de lapin, de chèvre, de mouton, de boeuf et avec des hématies humaines (ORh-) récoltées par ponction veineuse ou cardiaque et conservées en solution Alsever.

Hémagglutinations. Partant de chaque échantillon de sérum des dilutions binaires croissantes étaient préparées en solution saline isotonique en volume de 1 ml. 0,1 ml de sérum non-dilué et 0,1 ml de chaque dilution étaient mises en contact avec 0,1 ml de suspension d'hématies 2% en tubes d'hémagglutination (0,8/8 cm). Les suspensions ont été préparées avec des hématies conservées en solution Alsever et chauffées à 37°C — 40°C, afin d'éloigner les agglutinines à froid, éventuellement fixées sur ces hématies.

Chaque titrage a été effectué en 2 séries de tubes. Après agitation, une série était gardée pendant 3 heures à 37°C (bain-marie) et l'autre à + 4°C (frigidaire) jusqu'au lendemain. Pour cette dernière série, les dilutions et les suspensions étaient refroidies au bain de glace, avant d'être mélangées. Chaque série contenait en plus un témoin en solution saline isotonique.

La lecture a été faite à l'oeil nu (éclairage naturel), en inclinant et tournant avec précaution le tube au-dessus d'un miroir concave. La valeur inverse de la dilution correspondant à la plus grande dilution qui donnait encore une agglutination nettement visible (grumeaux fins) a été considérée comme titre de l'échantillon respectif.

Test antiglobulinique. Ce test fut effectué à l'aide de sérums précipitants anti-cheval, préparés sur des lapins et des cobayes, possédant des titres d'au moins 1/10.000 et préalablement absorbés avec des hématies normales de cheval. La réaction a été effectuée sous la forme du test « direct ». Des dilutions binaires de sérum anti-cheval étaient mises en contact, en volume de 0,1 ml avec 0,1 ml d'une suspension 2% des hématies à étudier (lavées 3 fois), en tubes d'hémagglutination (0,8/8 cm). Après avoir été agités, les tubes étaient laissés au repos pendant 4 heures à la température du laboratoire. Lecture comme plus haut.

RÉSULTATS

I. *Hémagglutination à chaud et à froid.* Les résultats des réactions d'auto-, iso- et hétérohémagglutination indiqués dans le tableau ci-joint, peuvent être résumés comme suit:

— Chez aucun des animaux on n'a pu constater la présence d'auto-agglutinines à froid ou à chaud. Quelques résultats douteux avec le sérum non-dilué n'ont pas été pris en considération.

— A l'exception de 3 résultats douteux, la présence d'iso-agglutinines à chaud ne fut constatée chez aucun animal (l'expérience portant sur un nombre très petit de chevaux, ces résultats ne fournissent évidemment aucune indication sur la présence d'iso-agglutinines chez le cheval en général). Des iso-agglutinines à froid à titre assez bas (1—32), existaient chez 3 animaux avant l'infection. Après l'infection, le titre de ces iso-agglutinines à froid demeura inchangé ou s'accrût légèrement (No. 3, de 1—32; No. 7, de 8—32), pour rediminuer ensuite. On n'a pas constaté l'apparition d'iso-agglutinines au cours de la maladie chez les poulains qui n'en possédaient pas avant l'infection.

— Des hétéro-agglutinines naturelles (à chaud et à froid) vis-à-vis des hématies de chèvre, de mouton ou de boeuf, ne purent être mises en évidence chez aucun animal. Après l'infection, des agglutinines anti-boeuf (1 poulain; à froid) et anti-chèvre (4 poulains; à froid et dans un cas à froid et à chaud) apparurent irrégulièrement et à un titre réduit (maximum 8). Des agglutinines anti-mouton (à froid et à l'exception d'un cas, à chaud aussi), ont été présentes chez tous les animaux, mais à titre bas (maximum 16).

— Des hétéro-agglutinines naturelles vis-à-vis des hématies de poule, de cobaye, de lapin et d'homme ont été mises en évidence chez tous les animaux. Les titres, allant de 2 à 24, étaient généralement plus élevés à froid qu'à chaud. Après l'infection, le titre demeura le même ou s'accrût faiblement et de manière irrégulière (une seule augmentation de 8 à 64, anti-lapin, chez le No. 3); dans aucun cas les titres ne dépassèrent 64. L'évolution des agglutinines anti-poule paraît être la plus régulière.

I. *Test antiglobulinique*. Ce test a été constamment négatif chez tous les animaux.

DISCUSSION

Diverses réactions ont été proposées pour le diagnostic de l'A.I.C. (1), les unes de type colloïdal ou de coloration, comme la réaction au sublimé ou à l'alcool ammoniacal, les autres de type immunologique, telles que la réaction de précipitation, d'isohémolyse ou de fixation du complément. Aucune de ces réactions n'a donné des résultats satisfaisants. Récemment, ALTARA, SERRA et GUARINI (2) ont décrit une réaction de fixation du complément avec un antigène préparé à partir de la rate d'animaux infectés. Mais bien que les auteurs aient ultérieurement modifié leur technique (2), la valabilité de cette réaction n'a pu être confirmée (2, 3, 4). Les difficultés s'expliquent par le manque de connaissances sur la nature et les propriétés du virus et probablement aussi par la coexistence de ce dernier avec les anticorps spécifiques dans le matériel utilisé (sang et rate).

Dans ces conditions, le but du présent travail a été, avant tout, du domaine purement pratique, c'est-à-dire qu'il s'agissait moins de clarifier les aspects sérologiques de l'A.I.C., que d'établir si certaines méthodes empiriques, utilisées dans d'autres affections à virus, ne pourraient servir au diagnostic de cette maladie. Dans la discussion des résultats obtenus, tout rapprochement plus détaillé entre les données sérologiques et les données cliniques et hématologiques sera intentionnellement évité, afin de pouvoir apprécier aussi objectivement que possible si les réactions utilisées sont, par elles-mêmes, susceptibles de fournir des indications concernant le diagnostic. Nous nous bornerons à signaler que durant la période du prélèvement des échantillons, 4 des 6 animaux ont présenté des accès caractéristiques d'A.I.C.

Les modifications sérologiques observées sont très réduites. Des auto-agglutinines à froid n'ont pu être mises en évidence, fait assez surprenant, ayant en vue l'aspect de grumeaux de grandes dimensions, observés dans le sang avant la coagulation. Cet aspect — d'ailleurs pareil à celui constaté dans le sang normal de cheval — est probablement dû exclusivement à la pseudo-agglutination.

Évolution des auto-, iso-, et hétéro-agglutinines chez les poulains infectés avec le virus de l'A.I.C.

Animal No.	Date de la récolte (1957)	Titre vis-à-vis des hématies																	
		propres		cheval		bœuf		mouton		chèvre		lapin		cobaye		homme		poule	
		ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.	ch.	fr.
1	15.I*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	—	2	—	4	1	4
	16.II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	16	—	1	2	8	4	8
	21.II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	16	—	2	4	16	2	8
	28.II	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	4	16	2	4	4	16	4	8
	19.III	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	8	64	—	2	2	16	4	16
	27.III	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	32	—	2	2	16	4	16
2	18.I*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	2	4	2	16	2	4
	16.II	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	16	2	4	2	16	4	8
	21.II	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	64	2	4	2	16	4	16
	28.II	—	—	—	—	—	2	8	8	2	2	64	64	2	8	2	8	16	16
	19.III	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	64	4	4	4	8	4	16
	27.III	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	64	4	4	2	16	4	16
3	22.I*)	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	8	4	8	8	8	16	8
	16.II	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	1	16	4	4	8	8	16	8
	21.II	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	1	32	4	2	8	8	4	8
	28.II	—	—	—	32	—	—	2	4	—	1	4	16	8	4	8	8	16	16
	19.III	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	4	64	2	4	32	32	4	32
	27.III	—	—	—	4	—	—	16	16	—	2	8	32	16	16	16	64	64	64
4	5.IV*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	32	2	2	4	8	2	8
	27.IV	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	8	32	2	2	4	8	2	8
	16.V	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	8	64	1	64	8	4	16	16
	25.V	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	4	32	4	2	16	16	8	8
	18.VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	16	2	4	32	64	4	8
5	5.IV*)	—	—	—	16	—	—	—	—	—	—	2	64	4	16	2	16	2	8
	27.IV	—	—	2	16	—	—	1	4	—	2	4	32	1	16	4	32	16	64
	16.V	—	—	—	16	—	—	2	4	—	1	8	64	4	32	4	32	4	16
	25.V	—	—	—	16	—	—	4	4	—	1	8	16	2	4	4	16	4	16
	18.VI	—	—	—	16	—	—	1	2	—	4	4	8	2	8	4	16	2	8
6	5.IV*)	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—	4	16	4	8	4	8	2	16
	27.IV	—	—	4?	32	—	—	—	—	—	—	8	64	4	2	8	16	4	16
	16.V	—	—	2?	16	—	—	4	8	—	—	32	64	2	8	8	64	16	16
	25.V	—	—	—	8	—	—	—	1	—	8	4	64	4	8	4	32	64	16

*) = avant l'infection
ch. = à chaud (37°C)
fr. = à froid (+4°C)
? = douteux

Les variations des iso-agglutinines sont trop inconstantes et réduites pour présenter une signification spécifique. Il est connu que le titre des iso-agglutinines varie dans beaucoup de maladies fébriles.

Le moment de l'apparition et le titre maximum des hétéro-agglutinines anti-mouton coïncident en lignes générales avec les accès cliniques de la maladie, mais les variations sont peu régulières et les valeurs absolues des titres se maintiennent au-dessous de la limite significative, indiquée habituellement dans la

mononucléose infectieuse (5). De même, les augmentations des titres des autres hétéro-agglutinines sont tout aussi réduites et peu régulières.

En résumé, ni l'auto-agglutination à froid, ni l'hétéro-agglutination ne paraissent présenter, dans ce cas, une signification diagnostique précise. Pour autant qu'elles se produisent, les modifications dans ce sens sont probablement dues au déséquilibre protéinique lié à toute maladie infectieuse ou fébrile.

Les résultats négatifs du test antiglobulinique coïncident avec les données d'autres auteurs (6). On peut en déduire avec une certaine probabilité, que l'anémie n'est pas provoquée par un mécanisme immunologique, c'est-à-dire qu'elle n'est pas due à une lésion des hématies provoquée par un auto-anticorps quelconque.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Chez 6 poulains les auto- et iso-agglutinines, ainsi que les hétéro-agglutinines anti-poule, anti-cobaye, anti-lapin, anti-chèvre, anti-mouton, anti-boeuf et anti-homme ont été étudiées avant et après l'infection avec le virus de l'A.I.C. Les hématies de ces mêmes poulains ont été soumises au test antiglobulinique.

2. Le test antiglobulinique a été négatif dans tous les cas.

3. Les modifications constatées à l'égard des auto-, iso- et hétéro-agglutinines sont trop faibles et irrégulières pour pouvoir servir au diagnostic de cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tanaka Y. — Bull. Off. Internat. Epizoot., 1953, **39**, 721.
2. Altara I., Serra A. et Guarini G. — Bull. Off. Internat. Epizoot., 1953, **39**, 708 et 1956, **45**, 186.
3. Lehnert E. et Viriden P. — Nordisk Veterinärmedizin, 1954, **6**, 707.
4. Palyusik M. — Acta Vet. Acad. Sc. Hung., 1956, **6**, 103.
5. Kolmer J. A. et Boerner F. — Approved Laboratory Technique, 1945, D. Appleton — Century Co., 643.
6. Spryszak A. et Krauss S. — Med. Weteryn., 1956. **12**, 393.

Dans l'exécution de ce travail, nous avons été assistés par MM. les Drs. Al. Pop et C. Couré, auxquels nous exprimons nos vifs remerciements.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1.6 жеребят исследовались на присутствие ауто и изоагглютининов и агглютининов против — курицы, против морской свинки, против-кролика, против — козы, против-овцы, против-быка и против-человека, перед и после заражения вирусом И А Л. Эритроциты тех-же жеребят исследовались при помощи прямого теста. противглобулинового

2. Противоглобулиновый тест был отрицательным во всех случаях.

3. Изменения установленные для ауто, изо и гетеро — агглютининов слишком невелики и незакономерны, для того чтобы служить для диагностических целей.

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE INFEKTIÖSE PFERDEANÄMIE

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Auto- und Isoagglutinine sowie die Heteroagglutinine gegen Erythrozyten von Hühnern, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziegen, Schafen, Rindern und Menschen wurden bei 6 Fohlen vor und nach der Infektion mit dem Virus der infektiösen Pferdeanämie untersucht. Bei denselben Fohlen wurde der direkte Antiglobulintest mit den roten Blutkörperchen durchgeführt.

2. Der Antiglobulintest war in allen Fällen negativ.

3. Die festgestellten Schwankungen der Auto-, Iso- und Heteroagglutinine sind zu geringfügig und unregelmässig, um für diagnostische Zwecke verwertbar zu sein.

SEROLOGICAL INVESTIGATIONS IN INFECTIOUS ANAEMIA OF HORSES

SUMMARY

1. The auto- and iso-agglutinins, and the agglutinins against chicken, guinea-pig, rabbit, goat, sheep, cattle, and human red blood cells, have been investigated in 6 foals before and after infection with the virus of infectious anaemia of horses. Direct antiglobulin tests were likewise carried out with the red cells of these foals.

2. The antiglobulin tests were negative in all cases.

3. As regards auto-, iso- and hetero-agglutinins, the changes recorded are too slight and irregular to be of any use in the diagnosis of the disease.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES *B. PYOCYANIQUES (PSEUDOMONAS AERUGINOSA)*

I. EMPLOI DES RÉACTIONS D'AGGLUTINATION POUR L'ÉTUDE DE 181 SOUCHES

par

T. Meitert et Eugenia Meitert

(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Services de la Dysenterie et Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 13 août 1959 —

Le problème de la structure antigénique des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, bien qu'abordé par Aoki (1) dès 1926, et surtout les dernières années, par divers auteurs, est loin d'avoir été élucidé, étant donné qu'à l'heure actuelle, un schéma international n'est pas encore établi.

Aoki, en 1926, affirme que de 50 souches étudiées (parmi lesquelles la *Pseudomonas fluorescens)*, on pouvait distinguer, à l'aide de la méthode d'agglutination, 22 types antigéniques.

Kanzaki (2) en 1934, étudiant 102 souches, trouve 34 types. Cet auteur, en examinant les souches d'Aoki, ne peut confirmer la subdivision effectuée par ce dernier, mais constate, par contre, la présence d'autres groupes, qui lui font entrevoir d'éventuelles modifications au cours des passages sur milieux de culture. Il émet, en même temps, l'hypothèse de l'existence de formes bactériennes « spécifiques » et « non-spécifiques ».

Boivin et Mesrobeanu (3) en 1937, ont isolé du *b. Pseudomonas aeruginosa* — par la technique de l'extraction à l'acide trichloracétique — un complexe glucido-lipidique, contenant un polysaccharide à rôle de haptène et possédant les propriétés générales des endotoxines isolées des germes du groupe *Salmonella*.

Christie (14) en 1948, effectue, à l'aide de la méthode de précipitation, la subdivision de 138 souches, en 13 groupes sérologiques et Van de Ende (4), en Afrique du Sud (1952) celle de 24 souches, en 6 groupes sérologiques. Ces deux auteurs ont également utilisé les réactions d'agglutination, qui présentaient toutefois, certaines difficultés.

Au Japon, Homma, Sagehashi et Hosoya (5) (1951), étudiant 17 souches à l'aide de techniques d'agglutination et absorption, distinguent 4 types sérologiques (A, B, C, D).

En 1957, Köhler (6), par précipitation avec formamide (méthode Fuller) réussit à classifier approximativement 70% de 383 souches étudiées, en 8 groupes sérologiques, tâchant, en même temps, d'utiliser les données obtenues, à des fins épidémiologiques.

La même année, Habs (7) utilisant des antigènes tués par chauffage, $2^1/_2$ heures à 100°, partage 70 souches en 12 groupes, sur la base des antigènes somatiques « o ». Les sérums anti « o », préparés par cet auteur, présentaient des titres réduits 1/200—1/800, atteignant rarement 1/1600.

Kleinmayer, en 1958 (8) effectue des agglutinations sur lame avec des antigènes vivants, obtenant de bons résultats et réussissant à confirmer les groupes sérologiques obtenus par Habs, dans le laboratoire où il a travaillé.

Kleinmayer, Scheiner et Graeff (9) prouvent que le *b. Pseudomonas aeruginosa* possède, à part un antigène « o » thermo-stable, des antigènes thermo-labiles. L'étude systématique de 100 différentes souches, a montré que deux souches peuvent avoir le même antigène « o », ainsi que des antigènes thermolabiles différents et inversement. Les antigènes labiles permettent l'identification des souches.

En 1959, Kleinmayer et Quincke (10) constatent que sur 500 souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées, 83,6% s'encadrent dans les 12 types décrits par Habs, avec prédominance du type 6. Étudiant 500 sérums normaux, ils constatent, chez 4,2% des réactions positives, surtout vis-à-vis des sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans le pus.

Cernomordik, en U.R.S.S., (11) a étudié, en 1956, un nombre de 160 souches et distingue 10 sérotypes. Cet auteur prouve que l'antigène spécifique de type, indiqué pour la réaction d'agglutination des *b. pyocyaniques*, est l'antigène flagellaire, alors que la fraction « o » de groupe jouerait un rôle secondaire dans le phénomène d'agglutination. Il montre également, que le chauffage à 60° diminue l'agglutination des germes, tandis que le traitement au formol, sulfate de zinc et autres substances, augmentent considérablement leur agglutinabilité. Cernomordik suppose que le *b. pyocyanique* serait muni d'une capsule fine, le protégeant contre l'agglutination, et que la destruction de cette capsule serait favorable à l'agglutination. A ce sujet, il faut rappeler le fait signalé par Mayr-Harting (12) démontrant que la sensibilité au formol, alcool et chaleur du *b. pyocyanique* n'est pas similaire à celle rencontrée chez d'autres espèces bactériennes. Bien qu'il montre l'hétérogénéité antigénique des souches, contrairement à l'avis de Munoz, Scherego et Weaver (13), il ne réussit pas à distinguer les antigènes flagellaires des antigènes somatiques.

Dans le présent ouvrage, nous nous proposons d'étudier dans quelle mesure serait possible une subdivision des *b. pyocyaniques* (181 souches indigènes), sur la base de l'agglutinabilité avec un nombre de 13 sérums anti-Pseudomonas, préparés avec différentes souches de *b. pyocyaniques*. Dans ce but, nous avons commencé par le choix des antigènes et les procédés de préparation des sérums, en vue d'assurer des conditions optimes de travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Souches: 181 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, pour la plupart isolées de coprocultures, le reste provenant de divers produits pathologiques (urine, exsudats purulents, etc.). Pour la réaction d'agglutination, on a utilisé des antigènes tués (alcool 50%, formol 1/500, chauffé 1 heure à 60°, chauffé 2 heures à 100°) et des antigènes vivants (d'abord cultures en eau peptonée, ensuite suspension en solution saline 8,5‰ culture de 24 heures sur gélose inclinée).

Sérums. On a préparé, à l'aide d'antigènes vivants et tués (alcool 50%, formol 1/500, chauffé 1 heure à 60°, chauffé 2 heures à 100°), des sérums sur lapins, par 3 inoculations intraveineuses, à 6 jours d'intervalle, en quantités croissantes (1/100, 1/50, 1/20 d'une culture sur gélose inclinée, suspendue en solution saline 8,5‰). Sept jours après la dernière inoculation, on a pratiqué des saignées d'épreuve, suivies de saignée à blanc, selon le cas. Les sérums non-glycérinés ont été conservés au frigidaire, tels quels. Il faut remarquer que les lapins, bien que diminuant sensiblement de poids, ont assez bien supporté l'immunisation avec des germes vivants. De 16 lapins inoculés avec des germes vivants, deux sont morts après la 1-ère ou 2—e inoculation. On a isolé chaque fois, le *b. pyocyanique* du foie et du sang récolté du cœur.

Techniques d'agglutination: On a commencé par la réaction d'agglutination en tubes avec dilutions de sérum, partant de 1/100 jusqu'à 1/25.600, en volume de 0,5 ml, utilisant comme antigènes, des cultures de *b. pyocyaniques*, âgés de 24 heures, en eau peptonée, ou antigènes tués, en dilution appropriées (densité néphélométrique équivalente à celle employée pour la réaction Widal), en volume de 0,5 ml. Incubation 2 heures à 37°, 18—20 heures au frigidaire à +4° et lecture.

Cette méthode a donné des résultats inconstants, lorsqu'on utilisait des antigènes vivants, vu que durant la conservation à 37° (et même au frigidaire), les germes se multiplient, formant pour la plupart, un voile fin à la surface du milieu qui, à la moindre agitation, se brise en petits flocons, empêchant la lecture et l'interprétation de la réaction d'agglutination. De meilleurs résultats ont été obtenus avec un antigène vivant, préparé par suspension d'une culture de 18—20 heures, sur gélose inclinée, en solution saline 8,5‰ et additionnée d'une goutte d'antigène aux dilutions du sérum, préparées en volume de 1 ml.

Vu l'ampleur que revêtent les expériences de l'agglutination, exigeant un nombre de plus de 20.000 tubes à essai, nous avons tâché de voir dans quelle mesure une réaction d'agglutination sur lame, en séries, pourrait remplacer celles en tubes. Après plusieurs essais, nous nous sommes fixés à la technique suivante: dans des plaques de verre à godets, on a ajouté par deux gouttes de sérum, dans les dilutions suivantes: 1/5, 1/10, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000+témoins — solution saline 8,5‰. A chaque dilution, on a ajouté deux gouttes d'antigène représentant une suspension en 5—6 ml solution saline 8,5‰ d'une culture de 24 heures sur gélose inclinée, (l'antigène gardé à +4°, était utilisable tout au plus 48 heures), obtenant ainsi les dilutions finales de sérum: 1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000. Les gouttes étaient homogénéisées à l'aide d'une baguette de verre. La lecture a été faite après 10—15 minutes, à la température du laboratoire, avec une loupe binoculaire « Citoplast » (obj. 1,6, oculaire 6,3), en notant les résultats d'après les critériums usuels d'interprétation des réactions d'agglutination sur lame.

Au début, les 181 souches ont été testées seulement avec les dilutions de 1/10 et 1/100, les dilutions plus grandes de sérum étant utilisées uniquement lorsqu'on obtenait (avec la dilution 1/100) une agglutination d'une intensité d'au moins +.

Des recherches comparatives des mêmes dilutions, entre la réaction d'agglutination en godets et celle en tubes, ont montré un parallélisme marqué entre les deux réactions, les titres des sérums en godets étant généralement de 1—2 dilutions inférieurs aux réactions en tubes.

Tableau I (a, b)

I. a

Sérums et antigènes souche 41

Sérums / Antigènes	Antigène avec lequel a été préparé le sérum: vivant	a	b	c	d
vivant	12800	<200	3200	1600	<200
a	<200	<200	<200	<200	<200
b	12800	3200	3200	3200	1600 3200±
c	400	<200	<200	400	<200
d	800	400	400±	400±	<200

I. b

Sérums et antigènes souche 42

Sérums / Antigènes	Antigène avec lequel a été préparé le sérum: vivant	a	b	c	d
vivant	12800	800	3200	3200	800
a	<200	<200	<200	<200	<200
b	800	200	400+ 800±	1600	<200
c	400	200	800±	400±	<200
d	400±	200±	<200	<200	<200

a = alcoolé 50%; b = formolé 1/500; c = inactivé 1 heure à 60°C; d = inactivé 2 heures à 100°C.

RÉSULTATS.

On a d'abord étudié l'agglutinabilité de divers antigènes (vivant, alcoolé, formolé et chauffé), préparés avec les souches No. 41 et No. 42, vis-à-vis des sérums préparés avec chacun de ces antigènes séparément. Les résultats sont consignés dans le tableau I (a. b.)

Il ressort de ce tableau que l'antigène vivant et l'antigène formolé de la souche No. 41 sont les plus agglutinables surtout envers le sérum homologue (préparé avec la souche vivante). Ces deux antigènes donnent en même temps les sérums aux titres les plus élevés.

L'agglutination des antigènes alcoolés, inactivés 2 heures à 100° et inactivés 1 heure à 60°, donne avec les sérums respectifs des titres bas ou très faibles, ainsi qu'avec les sérums préparés avec les antigènes vivant et formolé.

Tenant compte de ces résultats, nous avons entrepris la préparation de sérums avec des antigènes vivants, préparés avec différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le tableau II présente les titres des sérums obtenus avec les antigènes vivants et les antigènes chauffés 1 heure à 60°.

Tableau II

Sérum	Antigène		Sérum	Antigène	
	vivant	1 h. 60°		vivant	1 h. 60°
1	25.600++	800±	26	12.800+	400+
4	6.400+	200±	40	3.200+	400+
5	6.400±	1.600±	41	12.800+	400+
10	400+	400±	42	12.800+	400+
13	800+	800+	51	800+	0
14	25.600+	400+	57	25.600+	3.200+
15	6.400±	400±			

On constate, une fois de plus, l'agglutinabilité réduite des antigènes tués (1 heure à 60°), en comparaison avec celle des antigènes vivants.

Dans une étape ultérieure, on a étudié à l'aide de la même technique, l'agglutinabilité de 181 souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des sérums indiqués dans le tableau II, conformément au but initial: la subdivision sérologique des souches disponibles de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les 181 souches étudiées sont réparties comme suit:

a) Souches agglutinées de manière non-spécifique (avec tous les sérums) présentant en même temps, un degré plus réduit d'agglutinabilité en solution saline 8,5‰: souches en phase « R » (8 souches = 4,4%).

b) Souches qui n'agglutinent jusqu'au titre avec aucun sérum, et qui sont faiblement agglutinées avec un ou plusieurs sérums (27 souches = 14,9%).

c) Souches agglutinant jusqu'au titre, seulement avec les sérums No. 1 et No. 51 (20 souches = 11%).

d) Souches qui agglutinent jusqu'au titre avec un seul sérum, n'agglutinant pas d'autres sérums (6 souches 3,3%).

e) Souches agglutinant jusqu'au titre avec un seul sérum, présentant des agglutinations supplémentaires, avec d'autres sérums, à titre réduit (18 souches = 9,9 %).

f) Souches agglutinant jusqu'au titre avec deux ou plusieurs sérums et éventuellement à des titres plus réduits avec d'autres sérums (103 souches = 56,9%).

Graphique nr. 1

Type sérologique	Souche nr.	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
1-51	20 souches	▨											▨	
15	15		○	○	○			▨		○				
	69							▨		○				
	157						○	▨			○			
	168		○			○		▨						
	178		○					▨			○			
	181		○			○		▨						○
13	13				○	▨					○			
	169			○	○	▨	○				○			
	99				○	▨								
	104				○	▨				○				
	105					▨								
	116					▨								
	134					▨				○	○			
26	26								▨					
	70				○				▨	○	○			
	72				○				▨					
	148				○			○	▨	○	○			
	173								▨					
	189								▨					

▨ Agglutination jusqu'au titre
○ " réduite (sous titre)

Le groupe *c)* comprend les souches appartenant au type 1—51 (20 souches en tout), qui présentent une indépendance sérologique absolue envers le reste des souches étudiées. Les souches de type 1—51 sont agglutinées seulement avec les sérums respectifs (1 et 51) et non par les autres sérums. A leur tour, les sérums 1 et 51 (préparés avec les souches 1 et respectivement 51, s'avérant du même type sérologique), n'ont agglutiné que les souches de type 1—51.

Des groupes *d)* et *e)*, la majorité des souches appartiennent aux types sérologiques 13 (7 souches), 15 (6 souches) et 26 (6 souches) (graphique No. 1).

On observe, en plus de quelques souches agglutinant uniquement avec le sérum du type respectif, des agglutinations à titre plus faible avec d'autres sérums. Les sérums 13, 15 et 26, bien que présentant une relation avec d'autres souches de *b. pyocyaniques*, peuvent cependant être différenciés sur la base des réactions d'agglutination.

Le groupe *e)* comprend en plus, 4 souches qui, agglutinées jusqu'au titre par un seul sérum, appartiennent probablement aux types sérologiques respectifs (5, 10, 40 et 41).

Le groupe *f)* représente 56,9% des souches examinées (103 souches), qui ne peuvent être réparties en types sérologiques distincts, par leurs seuls caractères d'agglutinabilité avec divers sérums. Il est toutefois possible d'apprécier le maximum de fréquence probable des divers types sérologiques, plus ou moins apparentés entre eux.

Ainsi, du total de 181 souches, seulement 27 (14, 9%) ont agglutiné jusqu'au titre avec le sérum No. 4. La souche homologue No. 4 a été agglutinée, en plus,

Graphique nr. 2

Souche nr.	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
4													
81													
21													
179													
146													
147													
16													
87													
77													
66													
117													
57													
41													
160													
166													
65													
162													
171													
177													
174													
154													
165													
43													
150													
5													
170													
47													

Graphique nr. 3

Souche nr	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
5													
94													
10													
118													
89													
81													
21													
179													
191													
142													
93													
95													
158													
14													
77													
145													
40													
153													
121													
190													
151													
115													
144													
119													
135													
136													
187													
141													
143													
6													
152													
150													
154													
165													
43													
47													
170													
177													
111													
109													
184													
75													
92													
137													
97													
78													
117													
57													
41													

par les sérums Nos. 10 et 26, et à un titre plus réduit, par les sérums Nos. 14 et 41. Du graphique No. 2 où sont groupées toutes ces souches, on constate, qu'à part le sérum No. 4, ces souches sont également agglutinées — jusqu'au titre ou au dessous — par les sérums 5, 10, 14, 15, 26, 41 et parfois à des titres plus bas, par les sérums, 13, 40, 42 et 57.

On constate que le spectre agglutinant de la souche de type 4, est différent de celui de toutes les autres souches, de sorte que l'on pourrait attribuer ces dernières à des variantes antigéniques ou types différents. L'essai de grouper ces souches d'après le spectre agglutinant n'a réussi à donner des résultats que dans une petite mesure.

Le sérum No. 5, à part la souche homologue (No. 5), agglutine, jusqu'au titre, un nombre de 49 souches (27%), représentées dans le graphique No. 3.

Bien que la souche de type 5 soit agglutinée par le sérum No. 4, on observe que peu de souches de ce groupe ont agglutiné avec ce sérum. La grande majorité des souches agglutinées par le sérum No. 5, ont agglutiné, en même temps, avec

Graphique nr. 4

Souche nr.	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
4					o				o		o		
160				o		o							
65				o		o							
166			o	o									
171			o			o					o		o
162			o			o					o		o
177													
174								o			o		o
5						o							o
154				o		o	o		o				o
165				o									
170											o		
47													o
43				o	o						o		
150				o							o		o
135					o		o	o	o				o
136					o				o				o
187				o					o		o		o
141					o			o			o		
143					o						o		
97									o		o		o
6							o	o					
152		o		o									o
119									o				
175		o					o						
78				o		o							
57				o	o		o				o		
172		o			o			o					
182				o		o		o			o		o
161		o		o									
120				o									
100			o	o		o		o			o		o

Graphique nr. 5

Souche nr.	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
14		o		o						o	o		o
81				o			o			o			
21							o						o
186		o	o	o	o					o			
179										o			o
59			o					o					
165				o									
166			o	o									
47													o
150				o							o		o
170					o						o		
152		o		o									o
174			o					o			o		o
43				o	o						o		
177			o										
42				o							o		
119										o			o
41					o					o		o	
57				o	o		o				o		
66													

Graphique nr. 6

Souche nr.	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
10								o					
180							o						
4						o			o				
21							o	o					o
179									o				o
89						o		o		o			o
40					o				o				
163			o							o	o		o
5						o							o
77					o		o		o				o
162			o			o					o		o
171			o										o
47													o
170					o						o		
174			o					o			o		o
177			o										
176		o						o					
175		o	o			o							
97			o						o		o		
41					o					o			

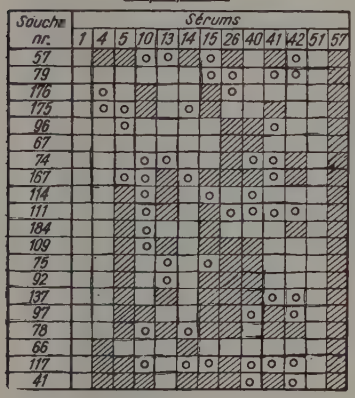
Graphique nr. 7

Souche nr.	Sérums 1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	51	57
40					o			o		o			
112				o			o						
73				o	o					o			
164		o	o	o						o	o		o
156				o						o			
59			o					o					
163			o							o	o		o
145					o			o	o	o	o		
153								o	o	o	o		o
144				o						o			
190				o							o		o
121				o				o					o
151		o		o		o				o			o
65				o		o	o				o		
143					o		o				o		
6						o	o						
141					o			o			o		
150				o								o	o
152		o		o									o
67													
96			o								o		
167			o	o							o		
137											o	o	
75					o		o						
92					o								

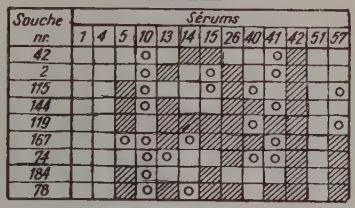
le sérum 57, et fréquemment avec les sérums: 10, 13, 14, 15, 26, 40 et 41, moins souvent avec le sérum 42.

La répartition d'après le spectre d'agglutination a montré, une fois de plus, la pluralité des variantes antigéniques rencontrées.

Graphique nr. 8



Graphique nr. 9



Le sérum No. 41 a agglutiné, à part la souche homologue, 31 souches (17,1%) (graphique No. 4).

Il faut remarquer que la souche No. 41 est encore agglutinée jusqu'au titre, par 7 sérums (4, 5, 10, 14, 15, 26 et 57) et à un titre plus bas, par trois autres sérums. On rencontre également des souches qui sont agglutinées jusqu'au titre, soit uniquement par le sérum No. 41 (souche No. 172), soit par un nombre réduit de sérums supplémentaires (souches 182, 161, etc.).

Pour le reste des sérums étudiés, le nombre de souches agglutinant jusqu'au titre est plus réduit:

Sérum No. 14 agglutinant jusqu'au titre: 20 souches (11%)
Sérum No. 10 agglutinant jusqu'au titre: 20 souches (11%)
Sérum No. 40 agglutinant jusqu'au titre: 25 souches (13,8%)
Sérum No. 42 agglutinant jusqu'au titre: 9 souches (5%)
Sérum No. 57 agglutinant jusqu'au titre: 20 souches (11%)

Les spectres agglutinants de ces souches sont présentés dans les graphiques Nos. 5, 6, 7, 8 et 9.

DISCUSSION

Des données sus-mentionnées, il résulte qu'en utilisant un nombre de 13 sérums différents, il est possible de préciser, à l'aide des agglutinations sur lames à godets avec des antigènes vivants, 4 types sérologiques distincts (1—51, 13, 15, 26) de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, représentant 21,4% du total des souches, alors que 56, 9% des souches, appartiennent au moins à 8 types ou variantes antigéniques supplémentaires, étroitement apparentées (4, 5, 10, 14, 40, 41, 42, 57). Le reste des souches (19,3%) sont des formes « R » ou hypo-agglutinables.

Il reste à individualiser chaque type sérologique séparément, par des réactions d'absorption croisée, en tenant compte des spectres agglutinants des

souches représentatives de type, correspondant aux sérums utilisés (graphique 10).

La grande variété des spectres agglutinants rencontrés, ainsi que l'existence de souches hypo-agglutinables, imposent non seulement la précision des types sérologiques, par des réactions d'absorption croisée, mais aussi le contrôle des processus de variabilité microbienne, souvent présentée par ce groupe. Dans le même ordre d'idées il reste à élucider les problèmes suivants :

— modifications antigéniques, au cours des passages sur milieux de culture (problème soulevé par KANZAKI (2) dès 1934), ainsi que l'existence possible de certaines phases spécifiques et non spécifiques, semblables à celles observées chez les *Salmonella*;

— éventuelles modifications de la structure antigénique des souches en voie de dégradation. Il n'est pas exclu que l'hypo-agglutinabilité de certaines souches ou bien la limitation du spectre agglutinant et implicitement, la grande variété de ces spectres, soient dues aux phases „S-R" plutôt qu'à la présence d'un nombre élevé de types sérologiques stables;

— existence, dans le cadre de la même population microbienne, de diverses variantes antigéniques, liées à la présence de diverses formes de colonies;

— modification de la structure antigénique, par l'influence des bactériophages endogènes, fréquemment rencontrés chez le groupe *Pseudomonas*.

Graphique nr. 10

Souche nr.	Sérums												Nombre des souches qui agglutinent jusqu'au titre avec le sérum correspondant		
	1	4	5	10	13	14	15	26	40	41	42	57	absolu	%	
1													20 souches	11	x
4						○				○			27 "	14,9	xx
5						○						○	49 "	27	xx
10								○	○				20 "	11	xx
13				○						○			7 "	3,8	x
14		○		○						○	○	○	20 "	11	xx
15		○	○	○									6 "	3,3	x
26													6 "	3,3	x
40					○					○			25 "	13,8	xx
41					○					○	○		32 "	17,1	xx
42				○							○		9 "	5	xx
57				○	○		○				○		20 "	11	xx
Souches hypoagglutinables													27 "	14,9	
" „R"													8 "	4,4	

* Types sérologiques distincts

** Au moins 8 types sérologiquement très rapprochés, correspondant aux souches types 4, 5, 10, 14, 40, 41, 42, 57, en total 103 souches qui agglutinent jusqu'au titre avec 2 ou plusieurs sérums. On indique le nombre de souches (ainsi que le pourcentage vis-à-vis du nombre total de souches étudiées), qui pourraient être integrées au type respectif, vu qu'elles agglutinent jusqu'au titre avec le sérum préparé avec la souche de type homologue.

Des données de la littérature, ainsi que des recherches effectuées, il ressort que les antigènes tués, dépourvus d'antigènes labiles, agglutinent faiblement et produisent des sérums à titres bas.

Les données de CERNOMORDIK (11) concernant la spécificité de type, de l'antigène flagellaire, ainsi que l'existence des antigènes labiles, signalés par KLEINMAYER et coll. (9), montrent l'importance particulière que présente l'utilisation des antigènes vivants, nous permettant d'effectuer des réactions sur lame et qui a donné de bons résultats, similaires à ceux obtenus par KLEINMAYER (8). Par cette méthode, on a réussi à différencier le *b. Pseudomonas aeruginosa*, à l'aide des antigènes labiles (flagellaires) qui ne sont pas gênés par la présence des agglutinines « O » à titre réduit.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires, afin de préciser la structure des antigènes « O » et « H », pour les mêmes souches, ainsi que la stabilité « *in vivo* » et « *in vitro* » des types antigéniques respectifs.

CONCLUSIONS.

1. Préparant des sérums avec divers antigènes de *Pseudomonas aeruginosa* (vivant, alcoolé, formolé, chauffé 1 heure à 60°, chauffé 2 heures à 100°) sur lapins, on constate que les sérums avec les titres agglutinants les plus élevés sont ceux préparés avec l'antigène vivant ou formolé.

2. Parmi les antigènes de *Pseudomonas* utilisés, l'antigène vivant et, en partie, l'antigène formolé présentent l'agglutinabilité la plus élevée.

3. Les antigènes alcoolé, inactivé 2 heures à 100° et celui inactivé 1 heure à 60°, ont donné des agglutinations faibles, produisant chez le lapin des anticorps pour les antigènes vivant et formolé, plutôt que pour les antigènes homologues (alcoolés ou inactivés).

4. Utilisant dans la réaction d'agglutination en séries (godets) 13 sérums différents anti-*Pseudomonas*, préparés avec des antigènes vivants, avec 181 souches de *Pseudomonas aeruginosa* (antigènes vivants), il a été possible de distinguer 4 types sérologiques et de reconnaître, en plus, 8 types ou variantes antigéniques étroitement apparentés, qui ne pourront être individualisés que par des réactions d'absorption croisée.

5. Vu la diversité des spectres agglutinants, les résultats obtenus soulèvent une série de problèmes concernant la stabilité des types sérologiques et les facteurs susceptibles de déterminer la variabilité de ces derniers.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aoki K. — Zbl. Bakt. I, Orig., 1926, **96,** 186.
2. Kanzaki K. — Zbl. Bakt., I, Orig., 1934/35, **133,** 89, 94, 99.
3. Boivin A. et Mesrobeanu L. — C. R. Soc. Biol., 1937, **125,** 273.
4. Ende M. Van de — J. Hyg., 1952, **50,** 405.
5. Homma I. Y., Sagehashi K. et Hosoya S. — Jap. J. exp. Med., 1951, **21,** 375.
6. Köhler W. — Z. Immunfrschg., 1957, **114,** 282.
7. Habs Irmgard — Ztschrft. Hyg. u. Infektkr., 1957, **144,** 218.
8. Kleinmayer H. — Zbl. Bakt., I, Orig., 1958, **170,** 570.
9. Kleinmayer H., Schreiner E. et Graeff H. — Z. Immunitätsfrschg., 1958, **115,** 492.
10. Kleinmayer H. et Quincke G. — Arch. Hyg. u. Bakt., 1959, **143,** 125.
11. Cernomordik A. B. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, **27,** 116.
12. Mayr-Harting A. — J. Gen. Microbiol., 1948, **2,** 31.
13. Munoz J., Scherego M. et Weaver R. H. — J. Bact., 1949, **57,** 269.
14. Christie R. — Australian J. exp. Biol. a Med. Sci., 1948, **26,** 425.

К ИЗУЧЕНИЮ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ

1. ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ В ИЗУЧЕНИИ 181 ШТАММОВ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ.

1. При помощи сывороток, изготовленных на кроликах, иммунизированных разными антигенами (живой обработанный спиртом, формалином. прогретый в течении часа при 60°, прогретый в течении 2 часов при 100°) установлено, что наиболее высокими агглютинирующими титрами обладают сыворотки, приготовленные при помощи живой или обработанных формалином антигенов.

2. Среди испытываемых антигенов синегнойной палочки, максимальную агглютинируемость проявляют живой и частично обработанный формалином антиген.

3. Обработанный спиртом антиген, антиген прогретый в течении 2 часов при 100° и в несколько меньшей степени антиген, прогретый в течении часа при 60°, агглютинируются в невысоких титрах, вызывая у кроликов антитела скорее по отношению к живому и обработанному формалином антигену, чем по отношению к гомологичным антигенам (обработанный спиртом или прогретый.)

4. Применение 13 разных сывороток против приготовленных при помощи живых антигенов, в реакциях агглютинации с 181 штаммом Pseudomonas pyo yanea. (живые антигены) дало возможность индивидуализировать 4 серологических типа и распознать еще 8 очень близких антигенных типов или вариантов, индивидуализация которых будет возможна только на основании реакции перекрестной абсорбции.

5. Результаты, полученные в связи с разнообразностью агглютинирующих спектров, выдвигают ряд вопросов, связанных со стойкостью серологических типов, способных обусловить измечивость данных типов.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER ANTIGENSTRUKTUR DES *B. PYOCYANEUS (PSEUDOMONAS PYOCYANEA)*

I. DIE VERWENDUNG DER AGGLUTINATIONSREAKTION ZUM STUDIUM VON 181 STÄMMEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Herstellung von Kaninchensera gegen verschiedene Antigene von *Pseudomonas pyocyanea* (lebend, Alkoholantigen, Formolantigen, 1 Stunde auf 60°C erhitzt, 2 Stunden auf 100° C erhitzt) ergab sich, dass die mit lebenden oder durch Formol abgetöteten Antigene erhaltenen Sera die höchsten Agglutinationstiter aufwiesen.

2. Von den verwendeten *Pseudomonas* Antigene weisen das lebende und, zum Teil, das mit Formol behandelte die stärkste Agglutinierbarkeit auf.

3. Mit Alkohol behandelte, bei 100° C zwei Stunden inaktivierte und, in geringerem Masse, bei 60° C während einer Stunde inaktivierte Antigene ergeben geringe Agglutinationstiter. Bei Kaninchen rufen sie eher die Bildung von Antikörpern gegen lebende oder mit Formol behandelte Antigene, als gegen das homologe Antigen (mit Alkohol behandelt oder erhitzt) hervor.

4. Durch die Anwendung von 13 verschiedenen, mit lebenden Antigenen hergestellten *Pseudomonas*-Seren, in Reihenagglutinationen auf Objektträgern mit Vertiefungen, bei der Untersuchung von 181 Stämmen von *Pseudomonas pyocyanea* (lebende Antigene), konnten 4 serologische Typen abgegrenzt und weitere 8 eng verwandte Antigentypen oder Varianten erkannt werden. Die Abgrenzung der letzteren wird erst auf Grund von gekreutzten Absorptionsreaktionen möglich sein.

5. Die hinsichtlich der Mannigfaltigkeit der Agglutinationsspektren erhaltenen Ergebnisse werfen, in Bezug auf die Stabilität der serologischen Typen und die Faktoren, die die Variabilität dieser Typen bestimmen könnten, eine Reihe von Fragen auf.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE ANTIGENIC STRUCTURE OF *PYOCYANIC BACILLI (PSEUDOMONAS PYOCYANEA)*

I. THE USE OF AGGLUTINATION REACTION FOR THE STUDY OF 181 STRAINS.

SUMMARY

1. Agglutinating sera have been prepared in rabbits by means of various *Pseudomona pyocyanea* antigens (living germs, alcohol-treated, formol-treated, heated at 60° C for one hour, heated at 100 C° for 2 hours). Sera prepared by means of live or formol-treated antigens were found to display the highest titres.

2. Of the *Pseudomonas* antigens used, live and, in part, formol-treated antigens displayed maximum agglutinability.

3. Alcohol-treated antigen, antigen heated at 100 C° for 2 hours, and, to a lesser extent, antigen heated at 60 C° for one hour, are agglutinated in low titres. In rabbits they induce the formation of antibodies which react more readily with live or formol-treated antigens than with the homologous ones (alcohol-treated or heated).

4. Serial agglutination reactions were carried out on well-slides with 13 different anti-*Pseudomonas* sera prepared by means of live antigens. A number of 181 *Pseudomonas pyocyanea* strains (live antigens) were tested. Four serological types could be individualized and another 8 closely related antigenic types or variants could be detected, the individualization of which will become possible through crossed absorption reactions.

5. The results obtained in connection with the diversity of the agglutination spectra set various problems concerning the stability of serological types and the factors which might be involved in their variability.

TABLE DES MATIÈRES

Contribution à l'étude des systèmes phago-bactériens entériques isolés des eaux du lac de Tekirghiol, par M. Ciucă, T. Meitert et Eugenia Meitert 1

Recherches sur le virus *Coxsackie*. IV. Considérations épidémiologiques (1953—1957), par C. Ionesco-Mihăieşti, R. Klein, F. Horodniceanu, M. Marcovici et Elena buimovici 9

Recherches biologiques, chimiques et immuno-chimiques sur le sérum anti-pertussis. Note I. Préparation du sérum anti-pertussis de chèvre, par Viorica Andreesco et Henriette Vainer 19

Étude chimique, immuno-chimique et biologique du sérum anti-pertussis de chèvre. Note II. Préparation de la gamma-globuline anti-coquelucheuse, par Henriette Vainer et Viorica Andreesco 29

Étude chimique, immuno-chimique et biologique du sérum anti-pertussis de chèvre. Note III. L'analyse par diffusion et immunoélectrophorèse en gel des sérums normaux et antipertussis de chèvre, des gamma-globulines et des albumines isolées de ces sérums, par Henriette Vainer et Viorica Andreesco 43

Éco-systèmes « phage-bactérie » et formes de « variation » de 565 souches de *Corynebacterium diphtheriae* d'origine épidémique. Distribution des différents types, par M. Ciucă, G. Calalb, Alice Saragea, Paula Maximesco, Ecaterina Stănică, T. Ieremia, Alexandra Ţupa, Eugenia Meitert et Cecilia Stoian 59

Les rapports entre la résistance des staphylocoques aux antibiotiques et leur sensibilité à l'action des bactériophages, par N. Nestoresco, Marcela Popovici et Ecaterina Alexenco 69

Lysotypie des *Shigella*. Note I. Schéma provisoire de lysotypie de *Sh. flexneri type* 2a à l'aide des spécimens de phages endogènes provenant des souches paracoli aérogènes et anaérogènes, adaptés à différentes souches d'Entérobactériacées, par G. Istrati 85

Lysotypie des souches de *Shigella flexneri* 2*a* provenant de quatre foyers de dysenterie. Note II, par G. Istrati 95

Distribution des types bactériophagiques des staphylocoques pathogènes en Roumanie, par Marcela Popovici, Ecaterina Alexenco, Aurica Filoti et Stela Novac 103

Contribution à l'étude des inclusions protoplasmatiques de la médulo-surrénale des cobayes, par C. Bonciu, R. Demetresco et Monica Petrovici 111

Les staphylocoques pathogènes chez les scarlatineux, par Coralia Baldovin-Agapi, Alexandrina Pasco, Valeria Henţiu, M. Migia, Florica Mihalco, E. Rişca, Eugenia Birţ, Lea Borşai et Coleta Georgesco 125

Contribution à l'étude du métabolisme des amino-acides dans la toxigénèse du bacille *Clostridium histolyticum*, par A. Marx 133

Recherches expérimentales concernant la méthode mixte (orale-souscutanée) de la vaccination antityphoïdique, par I. R. Vlădoianu, V. Rusu, Ligia Naş et F. Strejnico 137

Tests supplémentaires d'identification du *B. Pseudomonas pyocyanea (Ps. aeruginosa)*. Réaction de la cytochrome-oxydase et le comportement sur le milieu avec triphénylténtrazoliumchlorid, par Eugenia Meitert, T. Meitert et Thea Horodniceanu 149

Étude chimique comparative des différents types de méningocoques, par Eugenia Costin-Podhorski et Aurica Topciu 155

Action des toxines microbiennes sur les cultures de tissu. I. L'action de l'alpha-toxine staphylococcique sur les cultures de tissus embryonnaires humains. Essais de titrage, par I. Mesrobeanu, M. Georgescu, T. Ieremia, Natalia Mitrică, Domnica Drăghici et Maria Mateescu 161
Capacité « inductrice » de l'isotope radio-actif cobalt 60 (gamma irradiation) avec production de phage lytique actif des « éco- systèmes » phage souches de *Pseudomonas aeruginosa* soumis à l'action de cet agent, par M. Ciucă, T. Meitert, Eugenia Meitert et St. Meitert 173
Observations faites à l'occasion de l'étude des caractères des rechutes et récidives dans le typhus exanthématique épidémique expérimental chez le cobaye, par D. Combiescu 181
Étude enzymologique comparative du *Mycobacterium tuberculosis BCG* et ses variantes résistantes à la streptomycine, PAS et INH. I. Transaminases. II. Enzymes d'oxydo-réduction, par Eugenia Soru, Maria Istrati, Judith Sculptoreanu et Maria Paraschivescu 189
Évolution des agglutinines dans les leptospiroses humaines. Valeur de la réaction d'agglutination-lyse dans la détermination du type étiologique, par D. Combiescu, Nina Sturdza, M. Sefer et A. Klipper 201
Purification partielle de l'anatoxine et de la toxine staphylococcique alpha, par Lydia Mesrobeanu, Ecaterina Alexenco et Natalia Mitrică 211
Le mécanisme de l'immunité dans la Brucellose. III. Modifications histo-pathologiques chez les cobayes infectés expérimentalement, soumis à l'influence de certains facteurs modificateurs de l'immunité, par C. Bonciu, Ofelia Dimitriu, Th. Vasilescu et Al. Cerbu 221
Considérations sur la valeur de l'association de la lysogénéité de *S. typhi* à la lysotypie directe dans l'étude épidémiologique, par V. Rusu, Cornelia Combiescu, Marcela Nicolescu, Sanda Ţupa, I. R. Vlădoianu et Thea Horodniceanu . . 237
Recherches sur l'antigène Vi d'origine colibacillaire, par Ecaterina Papazian et Lydia Mesrobeanu 255
Étude des caractères biologiques des *Bacilles typhiques* isolés des malades de fièvre typhoïde vaccinés et non-vaccinés au T.A.B., par Cornelia Combiescu, E. Crăcea, Eva Gorun et Inge Elian 267
Observations sur le diagnostic de laboratoire et l'étiopathogénie de l'actinomycose. Étude de certaines souches d'*Actinomycètes* pathogènes, isolées chez l'homme, par C. G. Băcanu 283
Étude de certaines souches de *S. cholerae suis* cultivées en présence de facteurs avec action antimicrobienne, par Léonie Mintzer 295
L'action sporontocide et clino-prophylactique de la pyriméthamine simple ou associée à la cloroquine, par Eugenia Negulici, Piereta Constantinescu, Elena Teriteanu, P. Cortez, Aurelia Cristescu et Ionela Săndescu 303
Colonies atypiques de *staphylocoques*, par M. Balş et Aurelia Roman 317
Some data concerning the preparation of inactivated poliovaccine on an experimental scale, by C. Ionescu-Mihăieşti, Al. Ciucă, I. Mesrobeanu, B. Wisner, F. Horodniceanu, Dina Sergiescu, R. Klein, M. Zamfirescu, G. Gancevici, R. Arion, I. Stoian, A. Fényves et N. Gaico 321
L'obésité associée au diabète dans une colonie de souris blanches, par St. M. Milcou, Al. Pop, A. Lupulescu, Isabela Potop, Al. Turburi, Alis Oprişan et Elena Nedelniuc 329
Action des toxines microbiennes sur les cultures de tissus. II. Action cytotoxique des endotoxines glucido-lipidiques, par I. Mesrobeanu, M. Georgescu, T. Ieremia, Ecaterina Papazian, Domnica Drăghici et Lydia Mesrobeanu 345
Variation du métabolisme microbien en fonction de la peptone utilisée dans le milieu de culture. L'activité respiratoire, la catalase et les déhydrogénases des variantes « S » et « R » de *Typhi murium*, par Lydia Mesrobeanu et G. Teodorescu . 355
Contribution à l'étude de la biologie des *Klebsiella*. II. Étude biologique et immunochimique de deux variantes « S » de *Klebsiella*, par Silvia Eustatziou, Cella Barber, Maria Voinea et Gertrude Tulpan 367

Recherches sur les haptènes du *Bacille anthracis* et leur localisation dans la cellule bactérienne, par Cella Barber, Al. Petrovici, Eugenia Zilişteanu et I. Nafta 379
Sur un cas de « *Larva Migrans* » viscérale, par Angela Soresco, D. Panaitesco et V. Popesco 391
Contribution à l'étude de l'anémie infectieuse des chevaux. Note I. Évolution des modifications morphologiques sanguines et valeur diagnostique du myélogramme, par M. Iliesco, St. Berceanu et C. Coure 397
Contribution à l'étude de l'anémie infectieuse des chevaux. Note II. La ponction hépatique dans l'anémie infectieuse des chevaux. Sa valeur pour le diagnostic et l'étude de l'évolution des lésions, par M. Iliesco, St. Berceanu et C. Coure 409
Contribution à l'étude de l'action pathogène expérimentale des *Bacilles paratuberculeux* isolés de l'eau et de la boue du lac Noir de Sovata, par C. Bonciu, Olga Bonciu, Monica Petrovici et R. Demetresco 419
The transfer of anti-protein antibody production in the guinea-pig by means of lymphonodular cell suspensions, by Al. Ţurcanu et A. Fényves 439
Recherches sur une polyanatoxine anaérobie. I. Immunisation active expérimentale par l'anatoxine perfringens concentrée, purifiée et adsorbée sur phosphate d'aluminium, par A. Olaru, J. Bittner, H. Kranzdorf, Viorica Voinesco et A. Turburi 447
Recherches sur une polyanatoxine anaérobie. II. Immunisation active expérimentale avec l'anatoxine oedematiens concentrée, purifiée et adsorbée sur phosphate d'aluminium, par A. Olaru, J. Bittner, H. Kranzdorf, Viorica Voinesco et A. Turburi 461
Essais en vue d'obtenir des suspensions d'antigène « Vi » à efficacité prolongée, par E. Crăcea 473
Particularités des « éco-systèmes phage-bactérie » des souches de *Corynebacterium diphtheriae* type *gravis* isolées d'un foyer épidémique, par M. Ciucă, G. Calalb, Alice Saragea et Paula Maximesco 485
La génétique de la sporogénèse chez *B. anthracis*. Note I. Existe-t-il des races génétiquement asporogènes ? par N. Stamatin 493
La génétique de la sporogénèse des *B. anthracis*. Note II. Le rôle du phage dans la formation des spores chez les souches peu sporogènes, par N. Stamatin . . . 501
La valeur de la radiophotographie appliquée à l'étude des endémo-épidémies de fièvre « Q ». Note I. Observations radiologiques, par G. Zarnea, N. Alexandresco, Gr. Angelesco, G. Hodoş, H. Mladin et R. Voicoulesco 507
La valeur de la radiophotographie appliquée à l'étude des endémo-épidémies de fièvre « Q ». Note II. Corrélations clinico-épidémiologiques et de laboratoire, par G. Zarnea, N. Alexandresco, Gr. Angelesco, R. Voicoulesco, Honorina Ionesco et N. Krausz 517
Observations sur les porteurs de streptocoques hémolytiques dans des collectivités d'enfants, à caractéristiques épidémiologiques variées, par I. Ardelean, Coralia Baldovin-Agapi, C. Ieniştea, Ana-Maria Petresco, V. Dumitresco, Ortansa Paşolesco, T. Grigoriu, Al. Pteanco, R. Klein, Florica Negru et Ecaterina Vasiliu 527
Contribution à l'étude de la structure antigénique du *méningocoque*. I. Préparation et étude immunologique d'un antigène isolé du méningocoque, par Eugenia Soru et Aurica Topciu 541
Méthodes d'étude du vaccin BCG. II-e Mémoire. Tests expérimentaux sur cobayes. (Réaction locale, allergie et test de protection), par Virginia Botez, I. Angelesco, C. Bonciu, Maria Paraschivesco, I. Nafta et Monica Petrovici 551
Recherches sur les pénicillinases bactériennes. Note II. Titrage de la pénicillinase par une méthode diffusimétrique directe, par Al. Săsărman, Thea Horodniceanu avec la collaboration technique de Rodica Ciulley 563
Diagnosis of human leptospirosis by the complement fixation test with a single antigen, by Nina Sturdza, M. Elian and Gertruda Tulpan. Note I. 571

Contribution à l'étude des souches de *Mycobactéries saprophytes* et *atypiques*. Note I. Étude des caractères morphologiques, culturels, biochimiques et de la sensibilité aux antibiotiques, par SILVIA EUSTATZIOU, EUGENIA MEITERT, GERTRUDA TULPAN, MARIA ANTOHI et G. EUSTATZIOU 583

Quelques données expérimentales sur le mécanisme de l'immunité anti-gangréneuse, par J. BITTNER et VIORICA VOINESCO 601

Recherches sérologiques sur l'anémie infectieuse des chevaux, par M. ILIESCO et AL. TURCANU 617

Contribution à l'étude de la structure antigénique des *B. pyocyaniques (Pseudomonas aeruginosa)*. Emploi des réactions d'agglutination par l'étude de 181 souches, par T. MEITERT et EUGENIA MEITERT 623

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

A

Alexandresco (N.): 507, 517
Alexenco (Ecaterina): 69, 103, 211
Andreesco (Viorica): 19, 29, 43
Angelesco (Gr.): 507, 517
Angelesco (I.): 551
Antohi (Maria): 583
Ardelean (I): 527
Arion (R.): 321

B

Băcanu (C.G.): 283
Baldovin-Agapi (Coralia): 125, 527
Balş (M.): 317
Barber (Cella): 367, 379
Berceanu (St.): 397, 409
Birţ (Eugenia): 125
Bittner (J.): 447, 461, 601
Bonciu (C.): 111, 221, 419, 551
Bonciu (Olga): 419
Borşai (Leia): 125
Botez (Virginia): 551
Buimovici (Elena): 9

C

Calalb (G.): 59, 485
Cerbu (Al.): 221
Ciucă (Al.): 321
Ciucă (M.): 1, 59, 173, 485
Combiesco (Cornelia): 237, 267
Combiesco (D.): 181, 201
Companeţ (V.): 237
Constantinesco (Piereta): 303
Cortez (P.): 303
Costin-Podhorski (Eugenia): 155
Coure (C.): 397, 409
Crăcea (E.): 267, 473
Cristesco (Aurelia): 303
Cristian (Doina): 237

D

Demetresco (R.): 111, 419
Dimitriu (Ofelia): 221
Drăghici (Domnica): 161, 345
Dumitresco (V.): 527

E

Elian (Inge): 267
Elian (M.): 571
Eustatziou (G.): 583
Eustatziou (Silvia): 367, 583

F

Fényves (A.): 321, 439
Filoti (Aurica): 103

G

Gaico (N.): 321
Gancevici (G.): 321
Georgesco (Coleta): 125, 237
Georgesco (M.): 161, 345
Gorun (Eva): 267
Grigoriu (T.): 527

H

Henţiu (Valeria): 125, 237
Hodoş (G.): 507
Horodniceanu (Fl.): 9, 321
Horodniceanu (Thea): 149, 237, 563
Hügel (Ilse): 237

I

Ieniştea (C.): 527
Ieremia (T.): 59, 161, 345
Iliesco (M.): 397, 409 617
Ionesco-Mihăieşti (C.): 9, 321
Ionesco (Honorina): 517
Istrati (G.): 85, 95
Istrati (Maria): 189

K

Klein (R.): 9, 321, 527
Klipper (A.): 201
Kranzdorf (H.): 447, 461
Krausz (N.): 517

L

Lupulesco (A.): 329

M

Marcovici (M.): 9
Marx (A.): 133
Mateesco (Maria): 161
Maximesco (Paula): 59, 485
Meitert (Eugenia): 1, 59, 149, 173, 583, 623
Meitert (T.): 1, 149, 173, 623
Meitert (St.): 173
Mesrobeanu (I.): 161, 321, 345
Mesrobeanu (Lydia): 211, 255, 345, 355
Migia (M.): 125
Mihalco (Florica): 125
Milcou (St. M.): 329
Mintzer (Léonie): 295
Mitrică (Natalia): 161, 211
Mladin (H.): 507
Muscan (S.): 237

N

Nafta (I.): 379, 551
Naş (Ligia): 137
Nedelniuc (Elena): 329
Negru (Florica): 527
Negulici (Eugenia): 303
Nemeş (Rezeda): 237
Nestoresco (N.): 69
Nicolesco (Marcela): 237
Novac (Stela): 103

O

Olaru (A.): 447, 461
Oprişan (Alis): 329

P

Panaitesco (D.): 391
Papazian (Ecaterina): 255, 345
Paraschivesco (Maria): 189, 551
Pasco (Alexandrina): 125
Paşolesco (Ortansa): 527
Petresco (Ana-Maria): 527
Petrovici (Al.): 379
Petrovici (Monica): 111, 419, 551
Pop (Al.): 329
Popesco (V.): 391
Popovici (Marcela): 69, 103
Potop (Isabela): 329
Pteanco (Al.): 527

R

Rişca (E.): 125
Roman (Aurelia): 317
Rusu (V.): 137, 237

S

Săndesco (Ionela): 303
Saragea (Alice): 59, 485
Săsărman (Al.): 563
Sculptoreanu (Judith): 189
Sefer (M.): 201
Sergiesco (Dina): 321
Soiu (I.): 237
Soresco (Angela): 391
Soru (Eugenia): 189, 541
Stamatin (N.): 493, 501
Stănică (Ecaterina): 59
Stoian (Cecilia): 59
Stoian (I.): 321
Strejnico (F.): 137
Sturdza (Nina): 201, 571

T

Teodoresco (G.): 355
Teriteanu (Elena): 303
Topciu (Aurica): 155, 541
Totesco (E.): 237
Tulpan (Gertruda): 367, 571, 583
Turburi (Al.): 329, 447, 461
Ţupa (Alexandra): 59, 237
Ţurcanu (Al.): 439, 617

V

Vainer (Henriette): 19, 29, 43
Vancea (Margareta): 237
Vasilesco (Th.): 221
Vasiliu (Ecaterina): 527
Vlădoianu (I.R.): 137, 237
Voicoulesco (R.): 507, 517
Voinea (Maria): 367
Voinesco (Viorica): 447, 461, 601

W

Wisner (B.): 321

Z

Zamfiresco (M.): 321
Zarnea (G.): 507, 517
Zilişteanu (Eugenia): 379